



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

IARA DE OLIVEIRA BUTURE

**AVALIAÇÃO METABÓLICA DE BOVINOS LEITEIROS NO
PERIPARTO COMO FORMA DE DIAGNÓSTICO PRECOCE
DA HIPOCALCEMIA DA VACA LEITEIRA**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

IARA DE OLIVEIRA BUTURE

**AVALIAÇÃO METABÓLICA DE BOVINOS LEITEIROS NO
PERIPARTO COMO FORMA DE DIAGNÓSTICO PRECOCE
DA HIPOCALCEMIA DA VACA LEITEIRA**

Tese apresentada para a obtenção do título
de Doutor em Ciência Animal Área de
Concentração: Sanidade Animal da
Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Wilmar Sachetin
Marçal

Londrina
2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B989a Buture, Iara de Oliveira.

Avaliação metabólica de bovinos leiteiros no periparto como forma de diagnóstico precoce da hipocalcemia da vaca leiteira / Iara de Oliveira Buture. – Londrina, 2009.
153f. : il.

Orientador: Wilmar Sachetin Marçal.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Hipocalcemia – Teses. 2. Vaca parturiente – Teses. 3. β -endorfina – Teses. 4. Aspartano – Teses. 5. Fosfatase alcalina – Teses. 6. Gama Glutamiltransferase - Teses. I. Marçal, Wilmar Sachetin. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 619:636. 2

AVALIAÇÃO METABÓLICA DE BOVINOS LEITEIROS NO PERIPARTO COMO FORMA DE DIAGNÓSTICO PRECOCE DA HIPOCALCEMIA DA VACA LEITEIRA.

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina.

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Wilmar Sachetin Marçal
Universidade Estadual de Londrina
Orientador

Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves
Universidade Estadual Paulista de Botucatu

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
Universidade Estadual de Londrina

Prof^a. Dr^a Mara Regina Stipp Balarin
Universidade Estadual de Londrina

Prof^a Dr^a Nilva Aparecida Nicolao Fonseca
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 31 de julho de 2009.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal pelo Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal, sob orientação do Prof. Dr. Wilmar Sachetin Marçal.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram junto às agências e órgãos abaixo relacionados:

1. Fazenda São Pedro – Piraí do Sul –PR

2. Central de Radio Imuno Ensaio de São Paulo S/C Ltda. - Cries –São Paulo-SP

3.CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico /MCT

4.CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/MEC

5. FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / SETI

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Lauro e Lourdes pelo apoio incessante,
energia positiva, força, otimismo e perseverança,
Verdadeiros exemplos de vida
Unidos pelo verdadeiro amor.*

*Ao meu esposo Alexandre minha cara metade
meu ca...o...o amor para toda minha vida...
Ao meu filho Pedro Alexandre
que me fez descobrir o verdadeiro sentido
do amor, que me trouxe a plenitude da vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte maior de amor, sempre presente em minha vida, motivação de fé que nos encoraja a viver, estudar, trabalhar e buscar a felicidade.

Aos meus irmãos Lauro, Nara e Ismael, sempre presentes apoiando através do espírito familiar.

Aos meus sobrinhos Lauro Luiz, Felipe, Izael e Duane pelos momentos de alegria compartilhados.

Ao Prof^o Dr. Wilmar Sachetin Marçal, por ter acreditado em meu trabalho, pelos ensinamentos e por ser além de orientador, um verdadeiro amigo, homem sábio e digno de grande admiração por sua sabedoria e humildade.

À Prof^a Nilva Aparecida Nicolao Fonseca, pela forma amiga que me acolheu, pelo empenho e desenvoltura com que me ajudou a sanar as dúvidas de estatística e pelo apoio para o desenvolvimento do trabalho.

À Prof^a Mara Regina Stipp Balarin, pelo auxílio e apoio durante o período de realização deste trabalho.

Ao Prof^o Marcelo Marcondes Seneda pelo incentivo e apoio para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof^o Roberto Calderon Gonçalves pela dedicação que estudou e analisou este trabalho ajudando a enriquecê-lo com seu grande conhecimento.

Ao Prof^o Marco Antonio Fregonesi, pelas contribuições acrescentadas a este trabalho.

À amiga Rosa Toffolo, pelo companheirismo, amizade e presença de espírito nas horas necessárias.

À Rosali, que se mostrou sempre empenhada a ajudar e a encontrar soluções quando preciso.

À Laudicena Ribeiro, sempre pronta a ajudar e colaborar sempre que necessário, mostrando-se uma grande profissional.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, que me acompanharam e se dedicaram a ensinar durante este período.

Ao Dr. Mario Pradal, que se demonstrou à disposição em todos os momentos do desenvolvimento do projeto, sempre pronto a ajudar na pesquisa.

À equipe da CRIESP, pelo apoio técnico durante as análises do projeto.

À Prof^a Aparecida Valério, que se demonstrou ser grande amiga durante este período de trabalho.

Ao pessoal do laboratório, Zé Roberto, João e Inês pela ajuda durante o período da realização das análises.

À equipe da Fazenda São Pedro, pela dedicação nos momentos da colheita de material dos animais.

Aos meus colegas de pós-graduação, pelos momentos de aprendizado e alegrias compartilhados.

Aos integrantes da banca de qualificação, pelas contribuições acrescentadas a este trabalho.

Aos integrantes da banca de defesa, pelas contribuições acrescentadas a este trabalho.

A todos, que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

*À memória dos meus queridos avôs Pedro e Maria
homem e mulher de muita fé, que viveram da terra
e nela ensinaram seus filhos, netos e bisnetos que a
felicidade está na simplicidade, na união da família.*

BUTURE, I.O. **Avaliação metabólica de bovinos leiteiros no periparto como forma de diagnóstico precoce da hipocalcemia da vaca leiteira.** 176f. 2009. Tese (Doutorado em Ciência Animal - Área de Concentração: Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2009.

RESUMO

A hipocalcemia da vaca leiteira é de ocorrência mundial e é considerada um distúrbio metabólico da vaca parturiente. A enfermidade ocorre em vacas leiteiras de alta produção durante o periparto. Doença esta que leva a perdas econômicas na agropecuária leiteira por diminuir a produção de leite e fazer com que a vaca fique debilitada e diminuir a vida produtiva das vacas que apresentam a doença. Alguns ensaios atuais estão sendo conduzidos no sentido de se verificar a correlação entre o estresse e a intensidade na manifestação da hipocalcemia da vaca leiteira, sobretudo com o reconhecimento de indicadores biológicos, entre os quais os peptídeos opióides. Estudos recentes demonstram ainda que no período do periparto a vaca leiteira pode entrar em um balanço energético negativo. Neste processo, a vaca tenta satisfazer suas exigências energéticas através da lipólise e proteólise, as grandes quantidades de triglicerídeos circulantes sobrecarregam o fígado, causando um estado de lipólise hepática, induzindo às desordens bioquímicas e metabólicas, afetando sua produção e saúde de forma negativa. O presente estudo teve por objetivo avaliar a correlação entre opióides (fator stress), minerais (fator absorção) e função hepática (possíveis alterações) nas amostras de soro sanguíneo de vacas leiteiras no período do periparto, provenientes de rebanhos bovinos leiteiros da região sul do Estado do Paraná. A fim de minimizar prejuízos na produção leiteira procuramos estudar e mensurar a concentração do opióide endógeno: β -endorfina, dos minerais: Ca (cálcio), P (fósforo), Mg (magnésio) e determinar a concentração e a atividade sérica das enzimas hepática: FA (fosfatase alcalina), AST (aspartato-aminotransferase) e GGT (gama-glutamilttransferase) no plasma sanguíneo, no período do periparto de vacas leiteiras que sirvam como parâmetros para o diagnóstico precoce da Hipocalcemia da vaca leiteira. Os resultados desse estudo demonstram que a hipocalcemia da vaca leiteira está associada a vários fatores que tornam os animais predisponentes à doença. Considerando a importância clínica e econômica da hipocalcemia, novos estudos são necessários para avaliação de medidas de controle e profilaxia da doença nos rebanhos de bovinos leiteiros.

Palavras-chave: Hipocalcemia, Vaca parturiente, β -endorfina, Cálcio, Fósforo, Magnésio, função hepática, Parâmetro bioquímico, (AST) aspartato-aminotransferase, FA (fosfatase alcalina), GGT (gama-glutamilttransferase), Tratamento, Profilaxia.

BUTURE, I. O. **Metabolic evaluation of dairy bovine in the calving to the precocity of diagnostic of the hypocalcaemia in the dairy cow.** 2009. 176f. Thesis (Doctorate Degree in Animal Science, Concentration Area: Animal Sanity) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2009.

ABSTRACT

The dairy cow hypocalcaemia of world wide occurrence is considered a metabolic disturbance of the parturient cow, it occurs in dairy cows of high production during the periparto. This illness leads to economic losses in the dairy business, by the production decrease, making the cows weaker and having a short productive life when presenting the illness. Nowadays some essays are being carried on with the purpose of verifying the relation between the stress and the intensity of Hypocalcaemia manifestation in dairy cow, over all with the recognizing of biological peptide opiate indicators. Recent studies show that in the periparturient period of the dairy cow may get in to a negative energetic stock, in this process, it tries to satisfy its own exigencies through the enzyme lipase and proteolyses, the great amount of triglycerides in circulation overloads the liver causing a state of hepatic lipase, inducing to biochemical and metabolical disorders, affecting her production and health in a negative way. This present study had the purpose of evaluating the correlation among opioid (β -endorphin) stress factor, minerals (absorption factor) and hepatic function (possible alterations), in the samples of blood serum of dairy cows in the peripart period, from bovine dairy herds from the southern region of Paraná state. With the purpose of minimizing losses in dairy production we treed to study and mensure the concentration: β -endorphin, of minerals: Ca (calcium), P (phosphorus), Mg (magnesium), and the biochenical amounts which evaluate the hepatic function: ALP (alkaline phosphatase), AST (aspartate - aminotransferase) e GGT (gamma-glutayltransferase) from the blood plasma in the periparturient period in dairy cows that fit as parallels to the precocious diagnostic of the hypocalcaemia of the dairy cow. The results of this study show that hypocalcaemia in the dairy cow is associated to several factors that make animals predisposed to the ailment. Taking in consideration the clinical and economical importance of the hypocalcaemia, new studies are necessary to evaluate the control and prophylaxis mensures of the illness of the dairy bovines herds.

Key words: dairy cows, hypocalcaemia, parturient cow, β -endorphin, calcium, phosphorus, magnesium, hepatic function, biochemical parameter, aspartate - aminotransferase (AST), gamma-glutayltransferase (GGT), alkaline phosphatase (ALP), treatment, prophylaxy.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1. Perdas na produção de leite devido a doenças no pós-parto (% do total da lactação). Fonte Castro 2001.....23

Avaliação bioquímica do metabolismo mineral de bovinos leiteiros no periparto.

Figura 1. Valores ajustados de cálcio em função dos dias de avaliação em relação ao parto.....60

Figura 2. Valores ajustados de fósforo em função dos dias de avaliação em relação ao parto61

Figura 3. Valores de Ca e P e Mg para os diferentes grupos e o animal com hipocalcemia clínica (animal 009).....62

Figura 4. Valores de cálcio em função dos dias de avaliação em relação ao parto.....63

Figura 5. Níveis de fósforo em função dos dias de avaliação em relação ao parto.....64

Tabela 1. Médias observadas, em mg/dL, e erros padrão das variáveis Ca, P e Mg para os grupos G1(gestantes) e G2(não-gestantes).....59

Tabela 2. Médias observadas, em mg/dL, das variáveis Ca, P e Mg para os grupos G1(gestante) nos dias -7 e 0 (dia do parto) e grupo G2 (não-gestantes).....59

Tabela 3. Médias observadas, em mg/dL, e erros padrão (entre parênteses) de Ca, P, Mg, para os animais do grupo G1 de acordo com os dias de avaliação.....59

Tabela 4. Correlação entre Ca, P e Mg obtidas para o grupo G1 nos dias -7 antes do parto e no dia 0 (dia do parto) e grupo G2.....64

Indicadores metabólicos da função hepática de bovinos leiteiros no periparto.

Tabela 1. Médias observadas (em U/L) e erros padrão (entre parenteses) das variáveis FA, GGT, AST e Ca para os grupos G1(gestante) e G2 (não-gestantes).....74

Tabela 2. Médias observadas e erros padrão (entre parenteses) das variáveis FA, GGT, AST(em U/L) e Ca (em mg/dL) para os dados do grupo G1 nos dias -7 e 0 (grupo G1) e os dados do grupo G2.....75

Tabela 3. Médias e erro padrão (entre parênteses) das médias de FA, GGT, AST(em U/L) e de Ca(em mg/dL) para o grupo G1 (gestantes).....75

Tabela 4. Correlação entre Ca, FA, GGT e AST obtidas para o grupo G1 nos dias -7 antes do parto e no dia 0 (dia do parto) e grupo G2...76

Figura 1. Atividade sérica da AST para os animais do grupo G1 (gestante).
.....76

Figura 2. Valores observados de FA; GGT e AST para os animais do grupo gestante (G1) e não gestante (G2) e o animal que apresentou hipocalcemia clínica (009).....77

Padronização de técnica laboratorial e mensuração hematológica de opióides endógenos em bovinos leiteiros: estudo contributivo.

Tabela 1.	Concentração sérica média de Cálcio e de β -endorfina em mg/dL, em vacas (G1) gestantes na fase de periparto e em vacas (G2) não-gestantes.....	90
Tabela 2.	Concentração sérica média de Cálcio e de β -endorfina em mg/dL, em vacas gestantes nos dias -7 e dia 0 em relação ao parto (G1) e em vacas não-gestantes (G2).....	91
Tabela 3.	Médias observadas e erro padrão das médias (entre parênteses) de Cálcio e de β -endorfina para os animais do grupo G1 de acordo com os dias de avaliação.....	91
Figura 1.	β -endorfina em função dos dias de avaliação para animais do grupo G1 e para o animal que apresentou hipocalcemia.....	92
Figura 2.	Valores observados de Ca e β -endorfina para os animais do grupo gestante (G1), não gestante (G2) e animal que apresentou hipocalcemia.....	93

ABREVIATURAS

AST	Aspartato-aminotransferase.
FA (ALP)	Fosfatase alcalina.
β	Beta.
Ca	Cálcio.
Cl	Cloro.
DCAD	Diferença Cátion Aniônica da Dieta.
DGKC	Alkaline Phosphatase → Fosfatase alcalina.
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
IV	Intravenoso.
EOP	Peptídeos endógenos.
Gnrh	Hormônio gonadotrófico.
GGT	Gama-glutamilttransferase.
G1	Grupo um.
G2	Grupo dois.
HVL	Hipocalcemia da vaca leiteira.
IM	Intramuscular.
K	Potássio.
LDH	Desidrogenase láctica.
LH	Hormônio luteinizante.
Na	Sódio.
NRC	National Research Council.
P	Fósforo.
PEG	Polietilenoglicol.
pH	Potencial hidrogênio iônico.
PTH	Paratormônio.
RNA	Ácido ribonucléico.
S	Enxofre.
SC	Subcutâneo.
1,25-(OH) ₂ D ₃	Forma ativa da Vitamina D.

MS	Massa seca.
TGO	Transaminase-pirúvico-oxalacética.
UI	Unidades internacionais
UV	Ultravioleta.
VO	Via oral.

Unidades de medidas.

g	Gramma.
Kg	Kilograma.
mEq/dL	miliquivalente/ decilitro.
ml	Mililitro.
mg	Miligrama.
mg/dL	Miligrama / decilitro.
mmol/L	Milimol / litro.
nm	Nanômetro.
UI	Unidades internacionais.
UL	Unidades por Litro.

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
1.1 INTRODUÇÃO.....	19
1.2. CONCEITO.....	22
1.3 SINONÍMIA.....	23
1.4 EPIDEMIOLOGIA.....	23
1.5 PREJUÍZOS ECONÔMICOS.....	25
1.6 ETIOLOGIA.....	26
1.6.1 Fatores predisponentes.....	26
1.6.1.1 <i>Idade</i>	26
1.6.1.2 <i>Efeito racial</i>	26
1.6.1.3 <i>Superalimentação</i>	27
1.6.1.4 <i>Ordenhas</i>	27
1.6.1.5 <i>Fatores nutricionais</i>	27
1.6.1.6 <i>Individual</i>	28
1.6.1.7 <i>Estresse</i>	29
1.6.2 Fatores determinantes.....	29
1.6.2.1 <i>Homeostase da Calcemia</i>	31
1.7 SINTOMAS CLÍNICOS.....	32
1.8 DIAGNÓSTICO.....	34
1.9 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	35
1.10 PROGNÓSTICO.....	35
1.11 TRATAMENTO.....	36
1.12 PREVENÇÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	43

2 OBJETIVOS.....	50
2.1 OBJETIVO GERAL.....	51
2.2 OBJETIVO ESPECIFICO.....	51
3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO.....	52
3.1 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO METABOLISMO MINERAL DE BOVINOS LEITEIROS NO PERIPARTO	
Introdução.....	54
Material e Métodos.....	57
Resultados e Discussão.....	59
Conclusão.....	67
Referências.....	67
3.2 INDICADORES METABÓLICOS DA FUNÇÃO HEPÁTICA DE BOVINOS LEITEIROS NO PERIPARTO	
Introdução.....	71
Material e Métodos.....	74
Resultados e Discussão.....	75
Conclusão.....	80
Referências.....	80
3.3. PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA LABORATORIAL E MENSURAÇÃO HEMATOLÓGICA DE OPIÓIDES ENDÓGENOS EM BOVINOS LEITEIROS.	
Introdução.....	85
Material e Métodos.....	89
Resultados e Dscussão.....	91
Conclusão.....	96
Referências.....	96

4 CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS.....	102
5 APÊNDICES.....	110
Apêndice A - Aspartato-aminotransferase.....	111
Apêndice B - Beta Endorfina.....	118
Apêndice C – Cálcio.....	123
Apêndice D - Fosfatase Alcalina.....	132
Apêndice E – Fósforo.....	140
Apêndice F- Gama Glutamiltransferase.....	150
Apêndice G – Magnésio.....	158
6 ANEXOS.....	166
ANEXO A - Tradução da bula β -endorfina.....	167
ANEXO B – Planilhas com os resultados completos de todas as amostras em relação ao Ca, P e Mg.....	170
ANEXO C - Planilhas com os resultados completos de todas as amostras em relação a FA, GGT e AST.....	173
ANEXO D – Planilhas com os resultados completos de todas as amostras em relação a β -endorfina.....	176

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

O período de transição ou periparto é um dos momentos mais críticos da vaca leiteira, sobretudo em animais de alta produção. Não obstante todo estresse do parto, há ainda transtornos metabólicos que, frequentemente, podem surgir, tornando os animais debilitados e comprometendo economicamente os produtores rurais. Um desses problemas é a hipocalcemia da vaca leiteira, enfermidade muitas vezes presente em rebanhos de alta produtividade, gerando consequências indesejáveis na criação, afetando as vacas e interferindo no ciclo reprodutivo das mesmas. Encontrar meios de antecipar o diagnóstico desse transtorno metabólico é uma das ferramentas importantes da pecuária leiteira, tanto nacional, como mundial, pois evidencia a prevenção do problema. Por esse e outros aspectos, o perfil metabólico em bovinos leiteiros ganham periodicamente novas contribuições de pesquisas, com resultados cada vez mais promissores no campo do diagnóstico antecipado.

Pesquisas já eram realizadas tentando estabelecer valores para AST (aspartato-aminotransferase), FA (fosfatase alcalina) e GGT (gama-glutamilttransferase) por volta dos anos 50. Estudos foram realizados sobre parâmetros bioquímicos séricos, relacionados à avaliação da função hepática, procurando estabelecer valores de referência para os níveis séricos da atividade da AST, antigamente denominada transaminase-pirúvico-oxalacética (TGO), e da atividade sérica da GGT, Cornelius et al. (1959); Simesen e Storm (1973); Unglaub, Afschar e Marx (1973). Estudos foram realizados em relação a possíveis alterações nos valores de AST (aspartato aminotransferase), FA (fosfatase alcalina), associadas as doenças em vacas leiteiras, tentando observar os parâmetros normais e possíveis alterações nas atividades destas enzimas associadas a patologias (BATAVANI; MORTAZ; DAWOODI, 2003; OLISZEWSKI et. al. 2002). Além dos tradicionais perfis metabólicos, uma nova perspectiva aparece através da mensuração de opióides endógenos, entre eles a β -endorfina, que pode estar presente na hipocalcemia da vaca leiteira de forma a prejudicar o metabolismo de

cálcio e conseqüentemente concorrer para a instalação da enfermidade. Assim é oportuno destacar que pesquisas as quais concentrem esforços em ensaios desses moldes agregam conhecimentos no que se refere à doença, novas contribuições à pecuária leiteira, norteadas a prevenção como a melhor forma de evitar o estabelecimento clínico da enfermidade.

Segundo Horst, Goff e McCluskey (2003), na maior parte do tempo o organismo animal consegue controlar a concentração normal de Ca no sangue. Porém, ocasionalmente, ocorrem falhas que podem resultar na hipocalcemia da vaca leiteira. Outros estudos demonstram que a hipomagnesemia afeta o metabolismo do Ca, através da redução da produção do paratormônio (LITTLEDIKE; HORST, 1982), reduzindo a sensibilidade dos tecidos ao paratormônio (RUDE, 1998).

DeGaris e Lean (2008), comenta que o balanceamento das dietas podem favorecer o aparecimento da doença e que a diferença de partículas de cátion e ânion absorvidas da dieta determina o balanço geral do equilíbrio ácido-base e também o pH do sangue.

Na visão de Lea et al. (2006) as dietas e as concentrações de determinados minerais, como P, Ca, K, Mg, Na, Cl, S, usados no período periparto, afetam de forma substancial a incidência da hipocalcemia em vacas leiteiras. Seguindo o mesmo raciocínio, estudos realizados por Charbonneau, Pellerin e Oetzel (2006) demonstraram que uma determinada redução na diferença cátion aniônica na dieta (DCAD), pode diminuir o risco do aparecimento da patologia em animais de alta produção leiteira. Pesquisas demonstram ainda que o fornecimento da dieta pré-natal, além de diminuir acentuadamente o risco da hipocalcemia da vaca leiteira, também melhora de forma significativa os resultados reprodutivos, podendo ser observada ainda uma melhora na produção de leite (CORBETT, 2002; DeGROOT, 2004). Na concepção de Goff et al. (2008), o melhor tratamento para hipocalcemia da vaca leiteira pode ser a prevenção da patologia, evitando que esta acometa os animais.

A hipocalcemia da vaca leiteira é uma desordem do sistema metabólico cujo diagnóstico clínico, normalmente é feito com facilidade pelos profissionais da área, sendo a identificação do problema clínico feita com facilidade. O tratamento, desde que executado dentro de um determinado tempo, não apresenta grandes problemas. Por outro lado, sabe-se que grande parte dos

profissionais em nível de campo, não dispendo de auxílio laboratorial, tratam e medicam os animais de forma sintomática, não se importando em identificar com exatidão a origem da enfermidade. Para abordar com mais determinação este tema, deve-se ater não somente às respostas dos animais aos tratamentos, mas entender a complexidade que existe e que envolve todo o quadro clínico desenvolvido pelo animal. Segundo Kimura, Reinhardt e Goff (2006), a hipocalcemia reduz a ruminação, diminui a motilidade, aumentando as chances de deslocamento de abomaso, diminui também a quantidade de alimento ingerido, estimulando a mobilização de gordura, a hipocalcemia reduz também as contrações musculares, afetando inclusive a contração do esfíncter do teto, aumentando dessa forma o risco de mastite.

Estudos demonstram que aproximadamente vinte milhões de dólares são gastos anualmente no tratamento e controle da hipocalcemia. Estima-se que a metade deste valor é gasto com medicamentos para tratamentos da hipocalcemia da vaca leiteira. Estudos demonstram ainda que vacas afetadas pela hipocalcemia diminuem cerca de 60 kg da sua produção leiteira no total da lactação, perdem em torno de 15 kg de peso vivo, possuem menor vida produtiva e sendo assim, são descartadas de forma precoce. Horst, Goff e McCluskey (2003) comentam que um levantamento nos USA, sugerem que cerca de 5% das vacas leiteiras desenvolvem hipocalcemia da vaca leiteira, já no Brasil, Ortolani (1995) relata que 4,25% das vacas parturientes podem apresentar a afecção. Seja na sua forma clínica ou sub-clínica, a hipocalcemia, segundo Kimura, Reinhardt e Goff (2006), deve ser apontada como indicadora de grandes prejuízos, uma vez que reduz de forma acentuada a produtividade total da lactação da vaca afetada.

Na busca de uma máxima produção dos rebanhos leiteiros, o homem tem intensificado ao máximo a produção de cada animal e isso gera muitas vezes alterações, sejam de ordem metabólica, traumática ou mesmo infecciosa, que podem determinar um quadro clínico de decúbito. Dentre as possíveis alterações, as metabólicas apresentam grande importância. A complexidade etiológica desses tipos de alterações permitiu aos pesquisadores ingleses no início dos anos 50, atribuir a expressão Síndrome da Vaca Caída aos animais que apresentassem o decúbito pós parto, portanto, é certo afirmar que esta expressão pode ser uma complicação do decúbito, devido a uma variedade de outras causas. Várias causas sistêmicas podem estar envolvidas na etiologia desta síndrome, a hipocalcemia ou paresia

puerperal, também conhecida por paresia pós-parto, febre do leite, febre vitular é considerada a causa primária mais comum do decúbito em bovinos leiteiros.

Várias são as enfermidades metabólicas que podem acometer as vacas leiteiras de alta produção, entre as principais destacam-se as seguintes: hipocalcemia da vaca parturiente, hipoglicemia da vaca leiteira, acidose láctica ruminal, síndrome do animal caído, esteatose hepática, má nutrição energético-protéica e outras. O período de transição de quatro semanas antes e quatro semanas depois do parto, também conhecido como período do peri-parto, é caracterizado pelo crescimento do risco de enfermidades (STEVENSON; LEAN, 1998).

Este trabalho visa quantificar a β -endorfina, cálcio, fósforo, magnésio, fosfatase alcalina, aspartato-aminotransferase e gamma-glutamyltransferase em vacas leiteiras que apresentem ou não hipocalcemia, na intenção de melhor conhecer esses parâmetros em relação ao diagnóstico precoce da hipocalcemia da vaca leiteira, visando a diminuição de gastos com a enfermidade e também uma melhora na produção leiteira.

1.2 CONCEITO

Distúrbios na concentração de Ca levam a vaca a perder a capacidade de se levantar, uma vez que o Ca é extremamente necessário para os músculos, nervos e na coordenação dos movimentos, ainda segundo Horst, Goff e McCluskey (2003). Este distúrbio na concentração de Ca no sangue causa ainda diminuição na ingestão de alimentos, diminuição da ruminação e motilidade intestinal, baixa produção de leite e aumento da susceptibilidade a outras doenças. Segundo Ortolani (1995), a hipocalcemia é uma doença metabólica de curso agudo, que ocorre mais comumente na época do parto em fêmeas bovinas adultas, relacionando-se, portanto, com o começo da lactação. Caracterizando-se por hipocalcemia, fraqueza muscular geral, flacidez da musculatura esquelética e diminuição do tônus da musculatura lisa, colapso circulatório com alteração da pressão arterial e depressão da consciência. A incidência de hipocalcemia sub-clínica em vacas durante o período do periparto segundo Horst; Goff e McCluskey

(2003) é de aproximadamente 50% em vacas mais velhas, sendo que a hipocalcemia acomete principalmente vacas a partir da terceira lactação, de média ou alta produção na fase do puerpério, mais especificamente nos primeiros três dias pós-parto, devido às falhas na homeostase da calcemia,. Caracteriza-se por quadro clínico inicial de hiperestesia, seguido de depressão nervosa e paresia e, se não tratada, pode evoluir para um profundo quadro de depressão, podendo ocasionar a morte do animal. Apesar de ser chamada normalmente de febre do leite ou febre vitular, tais sinônimas não são as mais adequadas, pois a maioria dos animais afetados não apresenta febre ou hipertermia prolongada, mas sim hipotermia, na maior parte do quadro desenvolvido na hipocalcemia.

Este distúrbio metabólico costuma acometer vacas leiteiras imediatamente após o parto e nas ovelhas e cabras, a hipocalcemia se manifesta no último mês de gestação. A doença também foi observada em búfalas (MARÇAL 1996).

1.3 SINONÍMIA

Conhecida por vários nomes, dentre os mais comuns podemos citar: febre vitular, febre do leite, paresia puerperal, hipocalcêmica, paresia pós-parto, colapso puerperal, paresia obstétrica, coma pós-parto, apoplexia da parturiente, eclâmpsia.

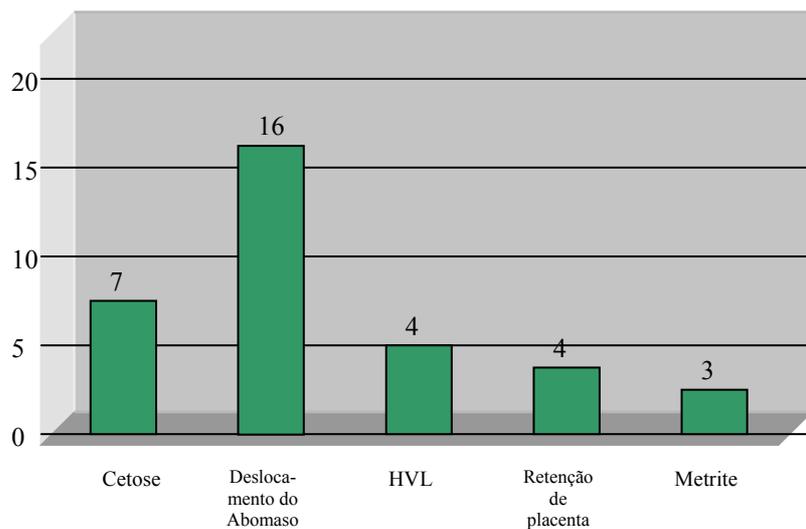
1.4 EPIDEMIOLOGIA

Estudos sobre a incidência da hipocalcemia da vaca leiteira demonstraram que nos Estados Unidos cerca de 5% dos animais são acometidos, Horst, Goff e McCluskey (2003). Em pesquisas realizadas no Brasil demonstrou-se que a incidência encontrada em vacas leiteiras foi de aproximadamente 4,25 %, com uma letalidade de aproximadamente 12,8% (ORTOLANI, 1995). Quando ultrapassa 20% é consideradas excessiva e um problema de rebanho (REBHUN, 1999). Segundo Marçal (1996), quanto mais velha ou multípara for a vaca leiteira,

maior a chance de apresentar a enfermidade. Ainda segundo o mesmo, nas condições climáticas do Brasil, a hipocalcemia pode ocorrer em qualquer uma das estações do ano.

Conhecida como uma das doenças comumente observada no período do parto, Castro (2003) cita que a incidência média da enfermidade é de 5% a 6%, mas estima-se que 50% das vacas no período de parto apresentem hipocalcemia sub-clínica após o parto. Estas vacas estariam susceptíveis às outras doenças do parto como cetose, retenção de placenta, deslocamento de abomaso e edema do úbere, todas estas enfermidades se correlacionam e basta que a hipocalcemia ocorra para a susceptibilidade às outras doenças ocorrerem também. Estudos demonstram que vacas com hipocalcemia são 23,6 vezes mais propensas a desenvolver problemas de cetose e quatro vezes mais propensas a apresentar retenção de placenta.

FIGURA 1. - Perdas na produção de leite devido a enfermidades mais comum no pós-parto (% do total da lactação).



Fonte: Castro (2003)

1.5 PREJUÍZOS ECONÔMICOS

A hipocalcemia diminui a produtividade e conseqüentemente diminui a lucratividade de uma leiteria (Horst, Goff e McCluskey, 2003) acredita-se que os prejuízos causados por esta enfermidade, ultrapassem a casa dos 20 milhões de dólares anuais, e estima-se que sejam gastos acima de 10 milhões de dólares somente com medicamentos. Atualmente existe no mercado uma diversidade muito grande de medicamentos para o tratamento desta enfermidade. Estudos demonstram que tanto a hipocalcemia clínica quanto a sub-clínica reduzem de forma acentuada a produção leiteira (Kimura, Reinhardt e Goff , 2006).

Os efeitos da hipocalcemia são mais evidentes no começo da lactação, os rendimentos leiteiros não são alterados negativamente apenas neste período e sim, durante todo o transcorrer da lactação, em função das desordens metabólicas sub-clínicas da doença. Rajala-Schultz e Grohn (1999) conforme esses autores, o rendimento de vacas com o distúrbio metabólico caiu por 4 a 6 dias pós-parto e a perda variou de 1,1 a 2,9 kg/dia na produção de leite. Em pesquisas realizadas nos Estados Unidos, foi constatado que a hipocalcemia afetou aproximadamente 5 a 9% das vacas leiteiras e que o tratamento deste transtorno foi oneroso e além disso as vacas afetadas pela hipocalcemia são 3 a 9 vezes mais suscetíveis a outros transtornos associados ao periparto. O custo direto de tratar casos clínicos de hipocalcemia é estimado em 15 milhões de dólares anuais e os problemas secundários causados pela paresia do parto podem aumentar o custo anual de produção em mais de 120 milhões de dólares nos Estados Unidos (Wang, Vélez e Risco, 1996).

Granjas leiteiras com animais de média e alta produção leiteira segundo Rebhun (1999), que optam por adotar manejo alimentar e nutricional adequado, com balanço de cátions e ânions na alimentação das vacas para controlar a hipocalcemia da vaca leiteira apresentam gastos com um custo aproximado que pode variar de 0,20 a 0,40 dólares por vaca ao dia. Quando realizada a prevenção desta enfermidade, o potencial de lucratividade aumenta uma vez que vacas acometidas pela hipocalcemia diminuem sua produção leiteira total em uma lactação, perdem escore corporal, ou seja, diminuem o seu potencial de produção, (Ortolani, 1995).

1.6 ETIOLOGIA

1.6.1 Fatores Predisponentes

1.6.1.1 Idade

No período do parto, foi observado que aproximadamente 50% das vacas mais velhas apresentam hipocalcemia sub-clínica, (Horst, Goff e McCluskey, 2003). Quanto mais velha for a vaca maior será a possibilidade de o animal apresentar a enfermidade, devido a uma menor absorção intestinal e reabsorção óssea de cálcio (Ortolani, 1995). O número de casos de hipocalcemia em vacas de terceira lactação ocorre duas vezes ou mais do que em vacas de segundo parto e nenhuma em vacas de primeira lactação, pois vacas multíparas da 3ª a 6ª lactações, produzem mais colostro que novilhas e vacas de segunda cria, o que leva a uma maior perda de cálcio nos primeiros dias de lactação (Rebhun, 1999).

1.6.1.2 Efeito Racial

Ortolani (1995) destacou que vacas da raça Jersey apresentam comparativamente a outras raças leiteiras, menor número de receptores para $1,25\text{-}(\text{OH})_2 \text{D}_3$ nos enterócitos, explicando dessa forma a maior incidência de hipocalcemia da vaca leiteira nesta raça, quando comparadas a outras raças leiteiras.

1.6.1.3 Superalimentação

Vacas leiteiras de alta produção, que são superalimentadas no período seco e conseqüentemente estão gordas, sofrem diminuição do apetite no pós-parto e entram em grave balanço energético. Assim a vaca tenta satisfazer suas exigências energéticas através da lipólise e proteólise e desta forma, a grande quantidade de triglicerídeos circulantes sobrecarrega o fígado, causando um estado de lipólise hepática ou fígado gorduroso. De uma forma geral, o grave balanço energético negativo induz a alterações bioquímicas, endócrinas e metabólicas, afetando sua saúde e alterando negativamente a reprodução e produção leiteira (OETZEL, 2000).

1.6.1.4 Ordenhas de Colostro

Estudos realizados demonstram que o colostro contém cerca de duas vezes maior concentração de cálcio (em torno de 2,2g Ca/L) que o leite comum (aproximadamente 1,1g Ca/L), e vacas ordenhadas continuamente, principalmente nas primeiras 24 horas pós-parto, apresentam maior risco de serem acometidas pela hipocalcemia (Ortolani, 1995).

Vacas com número maior de parições e lactações, segundo Rebhun (1999), produzem mais colostro que novilhas e vacas de segunda cria, gerando uma mobilização maior de cálcio para produção do colostro.

1.6.1.5 Fatores Nutricionais

Dietas balanceadas com diferenças negativas de cátion-ânion maiores ou menores, podem alterar o pH do sangue, podendo influenciar na predisposição à hipocalcemia, (Constable, 1999 e Goff, 2000). Em estudos realizados Ortolani (1995) comenta que a ingestão exclusiva de dietas ricas em oxalatos (capins do gênero *Setária*) ou ricas em gorduras que não formam

complexos com cálcio e zinco podem diminuir a disponibilidade do cálcio dietético, predispondo o aparecimento da enfermidade. Outro fator também importante no desencadeamento da hipocalcemia, seria a diminuição da absorção intestinal de Ca^+ nos primeiros três dias pós-parto (BOUDA; QUEIROS-ROCHA; GONZALEZ, 2000).

Golf (2008) comenta que a hipocalcemia da vaca leiteira está correlacionada à alcalose metabólica que pode ser induzida por dietas com altos valores de potássio. Já Melendez et al. (2002), comenta que o cálcio deve ser calculado nas dietas de modo a favorecer o metabolismo das vacas, mantendo o equilíbrio entre os gastos e o consumo equilibrando-se.

O tipo de alimentação do período do pré-parto está correlacionado à hipocalcemia da vaca leiteira (Rebhun, 1999). O mesmo autor cita que as necessidades diárias de uma vaca adulta de 600kg são 39g de cálcio, 24g de fósforo, 16g de magnésio e 65g de potássio, e sendo assim, quase todas as dietas para vacas secas com forragens e grãos, de uso habitual excedem, as necessidades mínimas.

A maioria das variáveis das equações de DCAD se tornam mais ou menos fixas, com exceção da variáveis K e Cl, que apresentariam maior oscilação (GOFF; HORST, 1997; BEEDE et al., 2001).

1.6.1.6 Individual

Certas linhagens apresentam determinada predisposição individual, sendo que algumas vacas repetem o mesmo problema de alteração metabólica mesmo após a adoção de medidas preventivas em relação à enfermidade (MARÇAL, 1996).

Heuer, Schukken e Dobbelaar (1999), citam que foi constatado que a hipocalcemia da vaca leiteira ocorre com maior frequência em vacas gordas. Foi verificado também, que essas vacas com escore corporal acima do normal apresentaram menor capacidade de concepção no primeiro serviço.

1.6.1.7 Estresse

Alguns ensaios foram conduzidos no sentido de se verificar a correlação entre o estresse e a intensidade na manifestação da hipocalcemia, sobretudo com o reconhecimento de indicadores biológicos, entre os quais os peptídeos opióides, ao longo da gestação, foi observado um progressivo aumento dos peptídeos opióides endógenos no sangue (Marques, 2001).

Em abordagem revisional realizada, Sciorsci, Dell'Aquila e Minoia (2001), relataram que as concentrações mais altas de peptídeos opióides endógenos (EOP), tais como β -endorfina, dynorphina, leu-enkephalin e a endomorphina, ocorreram com maior intensidade no periparto. Ainda segundo os autores, observou-se que seres humanos viciados em morfina ou em outro opióide, em estado de overdose, manifestaram sintomas semelhantes ao da hipocalcemia em bovinos leiteiros, tais como alterações nervosas, dificuldades respiratórias, tetania, coma e morte.

1.6.2 Fatores Determinantes

Em sua observação, Horst, Goff e McCluskey (2003), comentam que a demanda de cálcio no início de lactação testa o equilíbrio da homeostase do Ca de cada vaca.

O parto e o início da lactação, conforme Marçal (1996), são fatores determinantes para que ocorra a hipocalcemia, pois o teor de cálcio no leite é 10 a 12 vezes superior que o teor no sangue, pois, uma vaca com uma produção láctea de 20 litros de leite perde diariamente 20 a 30 gramas de cálcio por ordenha. Várias são as teorias propostas para explicar as causas da hipocalcemia. Entre as mais citadas está a de que vacas que recebem no período pré-parto dietas com alto teor de cálcio apresentam maiores chances de apresentar a enfermidade. Em trabalhos realizados, foi verificado que tanto dietas ricas em cálcio, como muito baixas deste macro elemento, parecem prevenir o aparecimento da enfermidade, entretanto, segundo Ortolani (1995), a maioria dos pesquisadores sobre o assunto não consideram os teores dietéticos de cálcio como sendo o único no desencadeamento

da hipocalcemia; os pesquisadores dão maior importância ao balanço cátion-aniônico.

Alguns pesquisadores estudam a associação do PTH (paratormônio) à falta de reabsorção de Ca pelos rins e também a prevenção da reabsorção nos ossos (GAYNOIR et al., 1989; LECLERC; BLOCK, 1989; GOFF et al., 1991; PHILIPO; REID; NEVISON, 1994).

O balanço do DCAD é dado pela diferença da concentração dietética (mensurada em miliequivalente por kg) dos principais cátions (sódio e potássio) e dos ânions (cloro e enxofre). Quando a diferença é positiva (mais cátions que ânions) diz-se que a dieta é catiônica e vice-versa no caso de dieta aniônica (SETTI; SCHALCH; ZANETTI, 1998; ORTOLANI, 1995). De maneira geral, os íons regulam indiretamente o grau de acidez sanguínea. No caso de haver um predomínio de cátions, existe uma tendência para ocorrer uma alcalose metabólica, enquanto que a maior concentração de ânions, levará a uma possível acidose metabólica (ORTOLANI, 1995).

Normalmente, as vacas leiteiras estão altamente adaptadas a ingerir dietas catiônicas, porém, estudos recentes indicam que no período pré-parto (um mês antes do parto) a ingestão de dietas ricas em cátions pode inibir a produção de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, diminuindo a capacidade do animal de absorver o cálcio dietético e de reabsorver este macro elemento dos ossos (ORTOLANI, 1995; MARÇAL, 1996). Segundo esses autores, acredita-se que a alcalose moderada no puerpério promova uma menor atividade da enzima renal 1α -hidroxilase, responsável pela transformação da vitamina D, ocorrendo o inverso quando uma acidose de pequena intensidade se desenvolve. Além de dietas catiônicas, sabe-se que também são fatores determinantes de hipocalcemia a ingestão, no período pré-parto, de rações com altas quantidades de fósforo, mais de 80 g por dia. Além disso (SETTI; SCHALCH; ZANETTI, 1998), a estase ruminal e ou intestinal prolongada no período puerperal diminui a ingestão de alimentos e a absorção de cálcio pelo intestino. As ordenhas completas e frequentes de colostro, principalmente nas primeiras horas pós-parto também determinam a perda irreversível de cálcio por este fluido.

1.6.2.1 Homeostase da Calcemia

Altas concentrações de fósforo podem bloquear a produção renal da 1,25-dihidroxi-vitamina D, podendo levar a uma hipocalcemia. As concentração do magnésio no sangue, deve variar entre 0,75 e 1,0 mmol/L ou mesmo 1,8 e 2,4 mg/dL, pois a deficiência de magnésio pode alterar a produção e atuação do paratormônio na absorção do Ca, (RUDE, 1998). Segundo Ellemberger, Newlander e Jones (1932) em vacas adultas os valores encontrados para o Ca no sangue é em torno de 2,1 a 2,5mmol/L ou o mesmo que 8,5 a 10mg/dL.

Os mecanismos pelos quais o organismo animal mantém a normocalcemia são mantidos basicamente pela atuação de dois grupos de hormônios antagônicos produzidos pela paratireóide e a tireóide, respectivamente, o paratormônio e a calcitonina. Ainda segundo (ELLEMBERGER; NEWLANDER; JONES, 1932; RUDE, 1998), caso exista uma pequena diminuição da calcemia, sensores rapidamente detectarão esta mudança e a produção de paratormônio será estimulada, ocorrendo sua secreção. Este hormônio estimula a atividade da enzima renal 1 a hidroxilase, a qual catalisa a transformação de 1- (OH) D₃ em 1,25-(OH)₂ D₃, um metabólito muito mais potente que o anterior, esta última vitamina irá regular, pelo aumento de síntese de RNA mensageiro, a produção de proteína-carreadora de cálcio a ser absorvido pelos enterócitos. Nos ossos, a 1,25-(OH)₂ D₃ atuará aumentando a atividade dos osteoclastos, os quais atuam retirando o cálcio dos depósitos ósseos, lançando-o na corrente sanguínea. No caso de hipercalcemia, entrará em ação a calcitonina, que aumenta a incorporação de cálcio ao osso, além de provocar calciúria.

Nas duas últimas semanas pré-parto e até o terceiro dia pós-parto, as vacas leiteiras apresentam certa dificuldade de manter a normocalcemia. Mesmo as vacas sadias apresentam uma pequena hipocalcemia temporária, que se inicia nas últimas semanas pré-parto e se estende até o 4º e 5º dias pós-parto. Isto ocorre porque a produção de vitamina D se encontra ligeiramente diminuída, associada à diminuição do apetite e da motilidade do sistema gastrintestinal, também, exatamente neste período, a demanda de cálcio é mais alta para a formação do leite colostrado, rico em cálcio. Desde que a hipocalcemia não seja exacerbada, as

parturientes não apresentarão quaisquer sinais clínicos evidentes (MARQUES, 2001).

Amostras de leite apresentaram quantidades de cálcio secretado no leite similares, em pesquisas realizadas tanto em vacas que não apresentaram o quadro de hipocalcemia como em vacas que apresentaram hipocalcemia no parto, indicando dessa forma que a secreção excessiva de cálcio no colostro não é necessariamente a causa primária do transtorno metabólico (WANG; VÉLEZ; RISCO, 1996),.

O cálcio e o fósforo compõem mais de 70% dos elementos minerais do animal e aproximadamente 99% do cálcio e 80% do fósforo encontram-se nos ossos e dentes. O cálcio intervém também na formação dos ossos, coagulação sanguínea, contrações musculares, ritmo cardíaco, excitabilidade neuromuscular, ativação enzimática e a permeabilidade das membranas, sendo que o cálcio absorvido pelo intestino e aquele oriundo da reabsorção óssea são as principais fontes de cálcio para o equilíbrio da calcemia (CESAR, 2003).

1.7 SINTOMATOLOGIA CLÍNICA

A vaca leiteira que apresenta hipocalcemia pode apresentar um quadro clínico ou sub-clínico. Segundo (KIMURA; REINHARDT; GOFF, 2006), o animal pode apresentar diminuição do apetite, dificuldade de contração muscular e diminuição dos movimentos ruminais. Outros sinais clínicos observados nas vacas que apresentam a enfermidade, são a perda da capacidade de se levantar, ocorre diminuição dos movimentos ruminais e da motilidade intestinal, os animais diminuem a ingestão de alimentos e ocorre queda na produção de leite comentam (HORST; GOFF;. MCCLUSKEY, 2003). Durante o aparecimento da hipocalcemia, a frequência cardíaca aumenta, segundo Rebhun (1999), apesar diminuir o rendimento cardíaco devido ao retorno venoso reduzido e menor contratilidade do músculo cardíaco.

Clinicamente a doença apresenta três estágios, segundo Castro (2003), inicialmente, as vacas desenvolvem um quadro de hipersensibilidade nervosa, caracterizada por agitação, tetania muscular, movimentos da cabeça, mioclonias e bruxismo. Na maioria das vezes, esta fase clínica inicial pode passar

desapercebida ao clínico. Antes de apresentar a sintomatologia, o animal geralmente passa por um estágio preliminar que pode durar várias horas, ocorrendo apenas anorexia, fezes escassas, sem alteração da temperatura corporal, frequência cardíaca e respiratória. Primeiramente a vaca hipocalcêmica começa com contrações involuntárias e frequentes dos músculos (tetania), com tremores na cabeça e membros, movimenta-se pouco e apresenta pouca ingestão de alimentos, pode haver agitação da cabeça, protrusão da língua e ranger dos dentes, os membros posteriores ficam rígidos, podendo levar à quedas. Com a intensificação da hipocalcemia, o quadro clínico se altera radicalmente, com aparente depressão nervosa, sonolência, midríase não responsiva à luz, atitude de auto-auscultação, paresia muscular e hipotermia, percebe-se aumento da frequência cardíaca, pulso fraco com paralisia ruminal e constipação. Como o animal pode permanecer muito tempo em decúbito esternal, surgem lesões musculares e, dependendo da intensidade do quadro, mesmo com a correção da calcemia, o animal não consegue mais permanecer em estação, manifestando o que se chama de síndrome do animal caído e neste caso, o prognóstico é ruim em relação à recuperação clínica, pois a partir de dois dias de decúbito, as chances de reversão do quadro se tornam cada vez menores. No próximo estágio, a vaca entra em decúbito lateral, quase em coma, não conseguindo permanecer em decúbito esternal; ocorre queda de temperatura e as complicações circulatórias aumentam, o pulso é fraco e as bulhas cardíacas são pouco audíveis e, devido ao decúbito lateral prolongado instala-se um quadro de timpanismo.

Caso a calcemia diminua mais ainda, o animal entra numa fase crítica, com perda total da consciência, alheio ao meio ambiente, manifesta paralisia muscular, taquicardia acompanhada de intensa hipotermia. O insucesso da terapia é grande nesta fase clínica por causa da toxemia. Todo o quadro clínico evolui em 12 a 24 horas e se não for tratado a tempo, ocorrerá morte por parada respiratória ou convulsões.

Segundo Ortolani (1995), que acompanhou a enfermidade em 39 vacas leiteiras, constatou que em apenas 5,1% dos casos observou-se os primeiros sinais clínicos, enquanto que na maioria dos casos (84,1%) os animais já se encontravam nas fases mais avançadas do quadro clínico.

O nível normal de cálcio no soro sanguíneo é de 10mg/DLL aproximadamente, ainda segundo Rebhun (1999), o grau de hipocalcemia não se

correlaciona perfeitamente com os sinais clínicos. Uma vaca com 7mg/dL de cálcio no soro sanguíneo é capaz de permanecer em estação, porém, apresenta meteorismo. Já com a concentração de 5mg/dL, o animal entra em decúbito esternal e, com concentrações menores que 4mg/dl, a maioria das vacas se tornam comatosas.

1.8 DIAGNÓSTICO

Dados de anamnese, evidência dos sinais clínicos e resposta ao cálcio intravenoso devem servir de base para o diagnóstico da hipocalcemia, segundo Marçal (1996). Em relação aos dados de anamnes, deve ser investigado tudo que possa favorecê-lo: quantidade de leite produzido, pois quanto maior o volume de colostro maior será a pré-disposição do animal à hipocalcemia; idade do animal, pois vacas com mais de três crias são mais suscetíveis; tipo de alimentação, porque as forragens à base de leguminosas são mais ricas em cálcio.

O clínico deve ter como base que a hipocalcemia está principalmente relacionada com o peri-parto e por essa razão este profissional deve evidenciar os sinais que são muito importantes numa exploração leiteira. Em relação à evidência de sinais clínicos é importante conhecer as fases clássicas e atribuir o tratamento imediato. A resposta ao cálcio intravenoso tem sido uma ferramenta para se dar o diagnóstico a campo, quando se supõe ser a hipocalcemia e não há como quantificar a calcemia por mensuração sanguínea laboratorial (MARÇAL, 1996; MARQUES, 2001).

1.9 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

O quadro de hipocalcemia pode ser confundido com o quadro de cetose, segundo Palhano (2001), embora essa enfermidade possua outra etiologia, sendo deficiência de carboidratos e rápido metabolismo de lipídeos. O autor afirma ainda, que não se pode esquecer de que a hipocalcemia ocorre no pós-parto imediato devido a grandes perdas de cálcio pela lactação, ao passo que, no caso de cetose, além do hálito característico de cetona, observa-se sua ocorrência alguns meses após a lactação, pois a vaca entra em balanço energético negativo, perde peso progressivamente e há deficiência na ingestão de carboidrato, levando ao metabolismo intenso de tecido gorduroso também de forma progressiva. Deve ser investigada a possibilidade da existência de outras enfermidades, segundo Marçal (1996). Dentre estas enfermidades, destacam-se as toxemias grave, causada por mastite flegmonosa ou por peritonite, a hipomagnesemia, a injúria física por lesão do nervo obturador ou por quedas, a acidose ruminal, ou seja, enfermidades que causam decúbito.

1.10 PROGNÓSTICO

Na maioria das vezes, o prognóstico é favorável desde que a hipocalcemia seja diagnosticada e tratada de forma precoce. Tanto Ortolani (1995), Rebhun (1999), quanto Radostits (2003) afirmam que normalmente as vacas com hipocalcemia que são tratadas com soluções de borogluconato de cálcio, respondem de maneira rápida e positiva ao tratamento. Por outro lado, quando o diagnóstico é realizado muito tarde, com os sinais clínicos já bastante avançados com decúbito lateral prolongado, timpanismo, paralisia muscular, hipotermia e coma, o prognóstico tende a ser desfavorável (ORTOLANI, 1995; MARÇAL, 1996; MARQUES, 2001).

1.11 TRATAMENTO

Experimentos para determinação de qual o melhor tratamento para hipocalcemia da vaca leiteira são realizados há décadas Mullen (1975) realizou experimento com tratamentos comparativos de 8g de Ca + 500mg de Aspartato de Magnésio e 12 a 36g de borogluconato de cálcio convencional, neste estudo, encontrando resultados semelhantes. Dois anos mais tarde, Mullen (1977) comparou 3 tratamentos (8g de cálcio, 8g de cálcio + 1,03g de magnésio e 6,2g de cálcio), foram analisadas as respostas após 24 horas e as respostas clínicas das relações de 8g dos dois primeiros tratamentos foram semelhantes, porém, os resultados com a aplicação de 6,2g de cálcio foram significativamente inferiores, com recidiva de aproximadamente 44% dos casos. Não houve evidências de que o magnésio somado à solução de cálcio melhorou a resposta clínica nos bovinos.

O tratamento sistêmico com sais à base de cálcio geralmente promove a cura da enfermidade e de acordo com Marçal (1996), o borogluconato de cálcio (com fósforo e magnésio), na dosagem de 1 a 2 ml/kg intravenoso de forma lenta e os glicocorticóides, tais como dexametasona, hidrocortisona, prednisolona e flumetazona podem ser usados como auxiliar no tratamento da hipocalcemia. Os glicocorticóides podem agir nesses casos, na estimulação do apetite, diminuição da produção de leite por impedir a captura de glicose pela mama, estimulação da atividade glicogênica, estimulação da mobilização de aminoácidos precursores de glicose e na diminuição da capacitação de glicose pelos tecidos periféricos. Pode ser usada também a tiamina ou vitamina B1, na dose de 4g/dia/IM por 5 dias, com a função de estimular o apetite, melhorar a absorção de cálcio e possuir ação antineurítica, recomendável para animais em decúbito. Outro procedimento seria evitar a prática da super-ordenha de leite colostrar nos primeiros dias pós-parto.

Soluções de borogluconato de cálcio intravenoso ou subcutâneo usados no tratamento da hipocalcemia conduzem ao restabelecimento rápido do tônus muscular e da função da musculatura lisa no trato gastrintestinal. Durante a administração de cálcio intravenoso, normalmente, as vacas eructam, defecam e urinam. Com a infusão de soluções intravenosas de cálcio há uma queda da frequência cardíaca pela melhora do tônus muscular Rebhun (1999) e se houver um aumento repentino da frequência cardíaca ou arritmias a infusão deve ser ministrada

mais lentamente ou até suspensa (Rebhun, 1999). As soluções de cálcio devem ser aquecidas próximas à temperatura corporal antes da infusão. O tratamento por via subcutânea não é conveniente em vacas com hipocalcemia em estado adiantado, pois possui um ritmo lento de absorção devido à circulação periférica prejudicada. Um frasco padrão de borogluconato de cálcio a 23% de 500 ml contém 10g de cálcio. Uma vaca leiteira holandesa adulta em bom estado corporal com 700 kg de peso, possui aproximadamente 210 litros de líquido extracelular, caso o nível de cálcio seja de 5mg/dL o déficit de cálcio é de 10,5 g e deste modo, um frasco de cálcio elevará o cálcio do soro para 10mg/dL. A maioria dos clínicos administra ainda, por via subcutânea, mais 250 ml. Ainda segundo (REBHUN, 1999), na maioria dos casos tratados na fase inicial da doença apenas um tratamento é suficiente, porém, se houver recidiva, deve-se considerar a administração de magnésio, além do cálcio. Já, segundo Melendez et al. (2002), para um melhor controle da hipocalcemia, uma dose é dada ao parir e outra dose deve ser dada entre 6 e 12h depois da primeira dose, de acordo com o quadro clínico do animal. Goff (2008) indica como tratamento a aplicação de Ca (borogluconato de cálcio) endovenosa e relata que as preparações comerciais contêm também magnésio, fósforo e glicose em suas fórmulas. O cálcio pode também ser aplicado via subcutânea, apresentando maior variação na absorção.

Existem outras opções para o tratamento da hipocalcemia segundo (REBHUN, 1999), como o gel e soluções orais de cálcio. Destas opções têm-se comprovado que apenas o cloreto de cálcio está adequadamente biodisponível para o tratamento clínico da hipocalcemia. As formas líquidas do cloreto de cálcio, quando administradas em vacas caídas, podem provocar pneumonia por aspiração e morte. O uso de cálcio oral requer perfeito funcionamento dos reflexos da deglutição para evitar que estes materiais irritativos entrem na traqueia. Também podem auxiliar no tratamento, o uso de compostos preparados de uso oral associados com vitaminas, dextrose e sais minerais, comenta Marçal (1996). No entanto, Goff (2008) comenta sobre o uso de cálcio oral, com a observação de que seria mais recomendado como tratamento preventivo, o autor também salienta sobre o uso da Vitamina D no tratamento preventivo da hipocalcemia da vaca leiteira.

Em pesquisas realizadas com o naloxone, um antagonista opióide, (SCORSCI; DELL'AQUILA; MINOIA, 2001) concluíram que o naloxone foi efetivo no tratamento da hipocalcemia tanto quanto a terapia de cálcio. Conforme os autores, a terapia eletiva é administrar esse tipo de antagonista que farmacologicamente ocupa os receptores de opióides nas células, mas sem afetar o comportamento, tendo uma meia vida de 15 a 20 minutos. Em um outro ensaio, os autores compararam o efeito do cálcio e do naloxone no tratamento da hipocalcemia, não encontrando diferença estatística na resposta. A terapia com borogluconato de cálcio recuperou 67% das vacas em menos de 30 minutos e 33% precisaram de tratamentos repetidos. Já com o uso de naloxone foram recuperadas 100% das vacas tratadas, sendo que 58,8% das vacas recuperaram-se dentro de 20 minutos, e em 41,2% das vacas foi necessário repetir o tratamento.

Além dos tratamentos com medicamentos, outros cuidados de manejo podem favorecer na recuperação dos animais com hipocalcemia, como evitar que os animais fiquem em locais inadequados com superfícies lisas e escorregadias, pois este cuidado pode prevenir a miopatia do esforço ou outras lesões musculoesqueléticas frequentemente observadas nas vacas hipocalcêmicas que se debatem para se levantarem em pisos escorregadios. Quanto à ordenha pode-se afirmar que não existe consenso entre os profissionais, porque a ordenha incompleta favoreceria o tratamento da hipocalcemia, mas por outro lado, esta vaca ficaria exposta a possíveis mastites. Rebhun (1999) manifestou-se a favor da ordenha completa das vacas que apresentem pré-disposição, ou mesmo, as vacas com a enfermidade.

O tratamento da hipocalcemia clínica na vaca leiteira deve começar o mais rápido possível, de preferência no primeiro estágio da doença (CASTRO, 2003). Ainda de acordo com o autor mencionado, vacas tratadas em estágios adiantados possuem queda na produção de leite, acarretando diminuição na lactação total do animal.

Segundo Charbonneau, Pellerin e Oetzel (2006), o melhor tratamento para a hipocalcemia é diminuir o risco de incidência da patologia usando a DCAD, de forma correta no período do parto das vacas leiteiras. No entanto, Lean et al. (2006), salienta que uma DCAD com baixo percentual de Ca, fornecida por longos períodos no período pré-natal, pode levar a baixa de Ca disponível nos ossos, aumentando dessa forma o risco de febre do leite ou fratura. O autor comenta

ainda que o aumento do Mg em dietas pré-parto pode diminuir a incidência de hipocalcemia.

1.12 PREVENÇÃO

Estudos foram realizados na tentativa de prevenir a hipocalcemia da vaca leiteira como a realizada por Westerhuis (1975), o autor comenta que no período seco, as vacas deveriam ser alimentadas com rações cujos níveis de Cálcio fossem baixos, sendo que o fósforo e a vitamina D devem estar em níveis adequados. Após o parto, o cálcio das rações deve passar para 1% da matéria seca, em relação ao fósforo e a vitamina D devem ser novamente adequados. A administração de 30 g de Mg diariamente, antes e depois de parir, é aconselhável para prevenir a hipomagnesemia, uma vez que esta pode ser confundida com a hipocalcemia. Estudos para prevenir a hipocalcemia em animais propensos, utilizando como base a restrição do cálcio (33,1 a 43,9g de Ca/dia) no período seco das vacas e alimentação rica em cálcio (148 a 196 g/dia) no pós-parto, fez com que não ocorresse a doença em 45 das vacas estudadas, sendo que apenas quatro animais mostraram cálcio sérico com menos de 7,5mg/100ml de sangue. Pesquisas como a realizada por Hibbs e Conrad (1976), que administrou vitamina D, por um período de 3 a 8 dias antes do parto preveniu 80% dos casos de hipocalcemia. Também foi observado que a ingestão contínua de vitamina D reduziu a incidência da enfermidade em vacas propensas de 60% para 26,1%. Sendo assim, os estudos sugerem que a vitamina D previne, de certa forma, a hipocalcemia. Segundo Sansom et al. (1976), vacas que receberam calecalciferol intramuscular duas horas depois de parir, sofreram menos hipocalcemia e hipofosfatemia que o grupo de controle. Houve uma pequena concentração de magnésio no plasma das vacas tratadas e esta experiência sugere que o colecalciferol possui um potencial para prevenção ou tratamento da hipocalcemia.

Em estudos realizados por Horst et al. (1977), observou-se que a vitamina D aumentou nitidamente durante o periparto que foi mantido durante 2 a 5 dias, sugerindo que a paresia pós-parto pode não ser resultado de síntese de vitamina D. Já Gast et al. (1979) realizaram testes com aplicação de 4mg de metabólitos da vitamina D, 1,25 dihidroxicolecalciferol na dose de 5ml em veículo

aquoso por via intramuscular. Baseado nas observações, foi indicado como método preventivo na hipocalcemia. No entanto, estudos foram realizados para investigar a eficácia de doses altas de colecalciferol e flumetazona para prevenção da hipocalcemia sub-clínica e clínica. Ao final do estudo, Karatzias (1992) verificou que os níveis de vitamina D₃ não sofreram alteração, concluindo que este procedimento para profilaxia da hipocalcemia não foi eficaz. Segundo Horst (1986), tem-se utilizado a administração parenteral de metabólitos de vitamina D, observando-se graus variados de êxito na prevenção da hipocalcemia da vaca leiteira.

Testes feitos com a vitamina D, concluíram que apesar de prevenir a hipocalcemia, alguns animais morreram quando tratados, 32 dias antes do parto. Os sinais de intoxicação mostraram calcificações metastáticas difundidas nas vacas, Littledike e Horst (1982) concluindo-se que a vitamina D possui baixa margem de segurança. Zeperitz et al. (1991), também observaram que a administração prolongada de metabólitos da vitamina D, como 25-hidroxivitamina D₃ e 1,25-dihidroxivitamina D₃ podem causar calcificação de órgãos internos e outros sinais de intoxicação por vitamina D.

Goff (2008) comenta ainda sobre o uso da Vitamina D no tratamento preventivo da hipocalcemia da vaca leiteira e salienta que a dose de Vitamina D que efetivamente previne a enfermidade está muito próxima da dose que causa calcificação metastática dos tecidos moles.

Foi constatado em pesquisas, que vacas com hipomagnesemia tinham menor capacidade para mobilizar cálcio. Segundo Contreras, Manston e Sansom (1982), estas vacas também apresentaram aumento do consumo de cálcio acima do recomendado pelo "*National Research Council – NRC*", que são de 39g de cálcio, 24g de fósforo, 16g de magnésio e 65g de potássio para vacas com 600 kg. Aparentemente não proporcionou nenhuma vantagem particular para melhorar o metabolismo do cálcio e prevenir a hipocalcemia, quando se proporcionou a dieta.

Em estudo realizado com vacas alimentadas com 71g de magnésio por dia, índices de mobilização de cálcio ósseo foram maiores que em vacas alimentadas com 17g de magnésio por dia. Durante o período seco, em vacas leiteiras a entrada de cálcio de 26,4g/dia era muito alta para estimular a reabsorção de cálcio dos ossos (VAN DE BRAAK; VAN'T KLOSSTER; MALESTEIN, 1987) comentaram ainda que rebanhos com "déficit" de magnésio no pré-parto podem desenvolver insuficiente mobilização de cálcio do osso.

Em pesquisa realizada com o PTH, onde foi realizada a administração intravenosa contínua do hormônio paratireóideo três dias antes do parto, este tratamento evitou a hipocalcemia em vacas alimentadas com dietas ricas em cálcio; entretanto, Goff, Littlekike e Horst (1986) classificam este procedimento como não prático e de difícil execução para ser utilizado de maneira rotineira. Métodos envolvendo a administração de óleos vegetais que se liguem ao cálcio, tornando este indisponível, impossibilitando a absorção do cálcio disponível na dieta dos animais, estão sendo estudados, salienta Wilson (2003).

A concentração total de potássio da dieta pode variar entre 1% e 1,8% ou mais; desta forma, resulta uma diferença cátion-ânion na dieta (DCAD) que varia de + 100 a + 350 mEq/kg/MS. Na dieta da vaca seca, segundo Beede (1992) estas dietas catiônicas e não o excessivo conteúdo de cálcio, são a causa principal da hipocalcemia de apresentação clínica, hipocalcemia sub-clínica e transtornos correlatos.

A partir dos estudos realizados para compreender a etiologia da hipocalcemia e encontrar uma forma de evitá-la, segundo Ortolani (1995) foram geradas medidas eficazes para prevenir essa enfermidade. Basicamente, às medidas preventivas estão centradas no oferecimento de dietas aniônicas nas últimas semanas que antecedem o parto. Grande parte dos alimentos triviais são catiônicos, como por exemplo o feno de alfafa + 431 mEq/kg; o capim napier + 349; a silagem de milho +156; o farelo de soja +266 de forma que se deve evitar oferecê-los no mês que antecede o parto, em especial aqueles com mais de + 400 mEq/kg,. Para tornar a dieta mais aniônica recomenda-se em rebanhos com incidência superior a 1% de hipocalcemia, que seja oferecido sais ricos em ânions, como: sulfato de cálcio , cloreto de amônia, sulfato de magnésio, sulfato de amônia e cloreto de cálcio.

O propionato de cálcio, segundo Pehrson, Svensson e Jonsson (1998), teve um efeito preventivo significativo quando administrado 36 horas antes e 24 horas depois do parto, podendo ser comparado com o cloreto de cálcio.

Dhimam e Sasidharan (1999) destacaram que os géis à base de CaCl_2 (cloreto de cálcio) podem ser usados na prevenção da enfermidade em vacas que apresentam pré-disposição à hipocalcemia da vaca leiteira.

Em outro estudo, segundo Pehrson et al. (1999), o uso de ácidos na alimentação não representa perigo à saúde de vacas secas, pelo menos, quando a diferença entre cátion dietético e ânion é maior que aproximadamente 1.200meq/dl ou - 140meq/kg de MS.

Os sais utilizados para promover alimentação anionica são em geral, de paladar desagradável possuindo também um custo alto. Sendo assim segundo Rebhun (1999), deve-se fazer a incorporação dos sais aniônicos em alimentos de melhor sabor, facilitando desta forma a ingestão pelo animal. O autor comenta que os ânions devem ser administrados aproximadamente três semanas antes do parto, porém, caso não haja lugar específico para que se proceda ao tratamento desses animais, esses sais podem ser fornecidos desde o princípio até o final do período seco.

Os desequilíbrios minerais em gado leiteiro estão frequentemente relacionados com o manejo nutricional durante o período seco. Segundo Oetzel (2000), a incidência de hipocalcemia, hipofosfatemia e hipomagnesemia podem ser minimizada por uma dieta nutricional bem formulada no período seco. A presença de sais aniônicos na dieta, neste período, pode trazer benefícios na prevenção da hipocalcemia, porém, esta suplementação pode reduzir o consumo de matéria seca, se esta não for de excelente qualidade e boa palatabilidade. Uma dieta balanceada em cátion-ânion pode influenciar em casos de hipocalcemia, aumentando ou diminuindo o pH do sangue das vacas leiteiras, comentam Constable (1999) e Goff (2000).

Em pesquisas realizadas com DCAD, chegou-se à conclusão de que o consumo de 4,5kg de um concentrado aniônico com balanço cátion-aniônico da dieta igual a - 240 mEq/kg de MS não foi suficiente para tornar a ração negativa e eficaz na prevenção da enfermidade. Em outro estudo, Setti (2001) observou que o balanço cátion-aniônico de +86 mEq/kg/MS foi semelhante ao de +173 mEq/kg/MS para os parâmetros estudados.

Cesco (2001) comparou três sais de cálcio para tratamento de hipocalcemia em vacas holandesas não prenhes, nas quais foi induzida a condição de hipocalcemia através de infusão intravenosa de Na₂ EDTA. Os três sais comparados foram: o borogluconato de cálcio a 20%, o borogluconato de cálcio a 15% e o cloreto de cálcio a 6%. Em um grupo controle, apenas foi administrada solução de soro fisiológico, e os resultados encontrados indicaram que todas as

soluções de cálcio utilizadas reverteram o quadro de hipocalcemia nos três estados clínicos.

O uso de dietas aniônicas por grandes períodos de tempo deve ser evitada, pois o ambiente ácido não é fisiológico. O objetivo de usar dietas aniônicas apenas antes do parto é o de colocar cálcio disponível quando ele é mais necessário ao organismo do animal, não sendo recomendado seu uso por períodos maiores que 21 dias antes do parto. Goff (2008) comenta também, que efeitos negativos são encontrados quando se usa esta dieta por um período de tempo prolongado, causando acidose metabólica e predispondo osteoporose.

Estudos estão sendo efetuados com o uso de zeolite (silicato de alumínio) na alimentação de vacas leiteiras, com o objetivo de reduzir a quantia de cálcio disponível para absorção da dieta das vacas no período do pré-parto (THILSING-HANSEN et al., 2002; KATSOULOS et al., 2005; PALLESEN et al., 2008.

REFERÊNCIAS

BATAVANI, R. A.; MORTAZ, E. K.; DAWOODI, M.A. 2003. Study on frequency, etiology and some enzymatic activities of subclinical mastitis in Urmia, Iran. *Small Ruminant Research*, London, n. 50, p 45 - 50, 2003.

BEEDE, D.K.; PILBEAN, T. E.; PPUFFENBARGER, S.M.; TEMPELMAN, R.J.. Peripartum responses of Holstein cows and heifers fed graded concentrations of calcium (calcium carbonate) and anion (chloride) three weeks before calving. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 84, p. 83, 2001.

BEEDE, D.K. The DCAD concept: transition rations for dry pregnant cows. *Feedstuffs*, London, v. 64, p. 12-19, 1992.

BOUDA, J.; QUEIROS-ROCHA, G.; GONZALEZ, F. H. D. Desequilíbrio de Cálcio Fósforo e Magnésio. In: GONZALEZ, F. H. D.; GORGES, J.B.; CECIM, M. (Ed.). *Uso de provas de campo e de laboratório clínico em doenças metabólicas e ruminais dos bovinos*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. p. 47-52.

CAMPOS NETO, O.; MARÇAL, W. S. Os fosfatos na nutrição mineral de ruminantes. *Revista dos Criadores*, São Paulo, n.793, p.8- 10, 1996.

CAMPOS, J. M. S. *Balanço dietético cátion-ânion na alimentação de vacas leiteiras, no período do pré-parto*. 1998. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CASTRO, A. L. Febre do leite: uma doença que deve ser tratada nos estágios iniciais. *Veterinary News*, New York, n. 64, p. 11, 2003.

CÉSAR, D. *Hipocalcemia puerperal*. Montevideo, 2003. Disponible em: <http://www.planagro.com.uy/publicaciones> Revista R 96Hipocalcemia_puerperal. Acesso em: jun. 2008.

CESCO, F. T. R. S. *Indução experimental de hipocalcemia em vacas: avaliações clínicas, bioquímicas e terapêuticas*. 2001. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal.

CHARBONNEAU, E.; PELLERIN, D.; OETZEL, G.R. Impact of lowering dietary cation-anion difference in nonlactating dairy cows: a meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, Champaign, n.89, p.537 – 548, 2006.

CONSTABLE, P. D. Clinical assessment of acid-base status. Strong ion difference theory. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, Philadelphia, v.15, n.3, p. 447-471, 1999.

CONTRERAS, P. A.; MANSTON, R.; SANSOM, B. F. Calcium mobilization in hypomagnesemic cattle. *Research in Veterinary Science*, London, v.33, p.10-16, 1982.

CORBETT, R. B. Influence of days fed a close-up dry cow ration and heat stress on subsequent milk production in western dairy herds. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 85 (suppl.1), p. 191, 2002.

CORNELIUS, C. E.; BISHOP, J.; SWITZER, J.; RHODE E. A. Serum and tissue transaminase activities in domestic animals. *Cornell Veterinarian*, Ithaca, v. 49, p.116-26, 1959.

DEGARIS, D. J.; LEAN, J. J. Milk fever in dairy cows: a review of pathophysiology and control principles. *The Veterinary Research*, New York, n.8, p.168, 2008

DEGROOT, M. A. *The effect of prepartum anionic supplementation on periparturient feed intake an behaviour, health and milk production*. 2004. Thesis (Doctor of Philosophy in Animal Sciences) - Oregon State University, USA, Oregon.

DHIMAN, T. R.; SASIDHARAN, V. Effectiveness of calcium chloride in increasing blood calcium concentrations of periparturient dairy cows. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 77, p. 1597-1605, 1999.

ELLENBERGER, H. B.; NEWLANDER, J. A.; JONES, C. H. Calcium and requirements of dairy cows. Weekly balances through lactation and gestation periods. *Vermont Agricultural Experiment Station*, Burlington, v.342, p.126-128, Jun. 1932.

GAST, D. R.; MARQUARDT, J. P.; JORGENSEN, N. A.; DELUCA, H. F. Potential use of 1,25-dihydroxycholecalciferol for prevention of parturient paresis. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 62, p. 1009-1013, 1979.

GAYNOR, P.J.; MUELLER, F. J.; MILLER, J. K.; RAMSEY, N.; GOFF, J. P.; HORST, R.L. Parturient hypocalcemia in jersey cows fed alfalfa haylage-based diets with different cation to anion ratios. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 72, p. 2525-2531, 1989.

GOFF, J. P. Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, Philadelphia, v. 16, p. 319-337, 2000.

GOFF, J. P.; HOST, R. L.; MULLER, F. J.; MILLER, J. K.; KIESS, G. A.; DOWLEN, H. H. Addition of chloride to a prepartal diet high in cations increases 1,25-dihydroxyvitamin D response to hypocalcemia preventing milk fever. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.74, p. 3863-3871, 1991.

GOFF, J. P. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *The veterinary Journal*, London, v.176, p.50-57, 2008.

GOFF, J. P.; HORST, R. L. Effects of the addition of potassium or sodium, but not calcium, to prepartum rations on milk fever in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.80, p.176-186, 1997.

GOFF, J. P.; LITLEDIKE, E. T.; HORST, R. L. Effect of synthetic bovine parathyroid hormone in dairy cows: Prevention of hypocalcemic parturient paresis. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.69, p. 2278-2288, 1986.

HEUER, C.; SCHUKKEN, Y. H.; DOBBELAAR, P. Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.82, p.295-304, 1999.

HIBBS, J. W.; CONRAD, H. R. Milk fever in dairy cows. VII. Effect of continuous vitamin D feeding on incidence of milk fever. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.59, p. 944-1946, 1976.

HORST, R. L.; EISMAN, J. A.; JORGENSEN, N. A.; DELUCA, H. F. Adequate response of plasma 1,25-dihydroxyvitamin D to parturition in parturient (milk fever) dairy cows. *Science*, London, v. 196, p.662-663, 1977.

HORST, R. L.; GOFF, J. P.; MCCLUSKEY, B. J. Prevalence of subclinical hypocalcemia in US dairy operations. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 86, (suppl. 1), p. 247, 2003.

HORST, R. L. Regulation of calcium and phosphorus homeostasis in the dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 69, p.04-616, 1986.

KARATZIAS, H. Untersuchungen über die Wirksamkeit von Cholekalziferol und Flumethason zur Prophylaxe der hypokalzämischen Gebarparese bei Milchkuhen. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, Hannover, v. 99, p.326-327, 1992.

KATSOULOS, P. D.; ROUBIES, N.; PANOUSIS, N.; ARSENO, G.; CHRISTAKI, E.; KARATZIAS, H. Effects of long-term dietary supplementation with clinoptilolite on incidence of parturient paresis and serum concentrations of total calcium, phosphate, magnesium, potassium and sodium in dairy cows. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v.66, p.2081-2085. 2005.

KIMURA, K.; REINHARDT, T. A.; GOFF, J. P. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.89, p.2588-2595, 2006.

LEAN, I. J.; DEGARIS, P. J.; MCNEIL, D. M.; BLOCK, E. Hypocalcemia in dairy cows: meta analysis and dietary cation anion difference theory revisited. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.89, p.669-684, 2006.

LECLERC, H.; BLOCK, E. Effects of reducing dietary cation-anion balance for prepartum dairy cows with specific reference to hypocalcemic parturient paresis. *Canadian Journal of Animal Science*, Ottawa, v. 69, p.411-417, 1989.

LITTLEDIKE, E. T.; HORST, R. L. Vitamin D3 toxicity in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.65, p.749-759, 1982.

MARÇAL, W.S. *Valores sanguíneos de bovinos nelore em pastejo de Brachiaria decumbens, suplementados com sal mineral naturalmente contaminado por chumbo*. 1996. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MARQUES, L. C. *Doenças metabólicas na vaca leiteira*. 2001. Monografia (Especialização em Medicina dos Animais de Produção) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MELENDEZ, H.; DONOVAN, A.; RISCO, C. A.; HALL, M. B.; LITTELL, R.; GOFF, J. Metabolic responses of transition Holstein cows fed anionic salts and supplemented at calving with calcium and energy. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 85, p.1085- 1092, 2002.

MULLEN, P. A. Clinical and biochemical responses to the treatment of milk fever. *Veterinary Record*, London, v.97, p.87-92, 1975.

MULLEN, P. A. Milk fever: a case against polypharmacy solutions. *Veterinary Record*, London, v. 101, p. 405-407, 1977.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, *Nutrient Requirements of dairy Cattle*. Washington, DC: National Academy Press, 2000.

OETZEL, G. R. Management of dry cows for the prevention of milk fever and other mineral disorders. *The Veterinary clinics of North America: Equine Practice*, Philadelphia, v.16, p.369-386, 2000.

OLISZEWSKI, R.; NUNEZ De KAIRUZ, M. S.; GONSALEZ De ELIAS, S.N.; OLIVER, G. Assessment of β -glucuronidase levels in goat's Milk as na indicator of mastitis: comparison with other mastitis detection methods. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 65, p. 864-866, 2002.

ORTOLANI, E. L. Aspectos clínicos, epidemiológicos e terapêuticos da hipocalcemia de vacas leiteiras. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 47, n. 6, p. 799-808, 1995.

PALHANO, H. B. Hipocalcemia: um problema que afeta vacas e cabras leiteiras, ovelhas e cadelas. *Veterinary News*, New York, n. 52, p. 4-5, 2001.

PALLESEN, A.; PALLESEN, F.; JORGENSEN, R. J.; THILSING, T. Effect of precalving zeolite, magnesium and phosphorus supplementation on periparturient serum mineral concentrations. *The Veterinary Journal*, London, v. 175, n. 2, p. 234-239, Feb. 2008.

PEHRSON, B.; SVENSSON, C.; GRUVAEUS, I.; VIRKKI, M. The influence of acidic diets on the acid-base balance of dry cows and the effect of fertilization on the mineral content of grass. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 82, p. 1310-1316, 1999.

PEHRSON, B.; SVENSSON, C.; JONSSON, M. A comparative study of the effectiveness of calcium propionate and calcium chloride for the prevention of parturient paresis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 81, p. 2011-2016, 1998.

PHILLIPPO, M.; REID, G.W.; NEVISON, I.M. Parturient hypocalcemia in dairy cows: effects of dietary acidity on plasma minerals and calciotropic hormones. *Research in Veterinary Science*, London, v. 56, p. 303-309, 1994.

RAJALA-SCHULTZ, P. J.; GROHN, Y. T. Culling of dairy cows. Part III. Effects of diseases, pregnancy status and milk yield on culling in Finnish Ayrshire cows. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, v. 41, p. 195-208, 1999.

REBHUN, W. C. *Enfermedades del ganado vacuno lechero*. Zaragoza: Acribia, 1999.

RUDE, R. K. Magnesium deficiency: a cause of heterogeneous disease in humans. *Journal of Bone and Mineral Research*, Washington, v.13, p. 749-758, 1998.

SANSOM, B. F.; ALLEN, W. M.; DAVIES, D. C.; HOARE, M. N.; STENTON, J. R.; VAGG, M. J. Use of lalpha-OH cholecalciferol in preventing post parturient hypocalcaemia and its potential value for the prevention of milk fever in dairy cows. *The Veterinary Record*, London, v. 99, p.310-312, 1976.

SCIORSI, R. L.; DELL'AQUILA, M .E.; MINOIA, P. Effects of naloxone on calcium turnover in cows affected by milk fever. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.84, p. 1627-1631, 2001.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, Washington, v. 30, p. 507-512, 1974.

SETTI, M. C. ; VIEIRA, P. F. ; ZANETTI, M. A. ; MARTINS, A. S. ; GARCIA, J. A. S. ; MELO, G. M. P. Balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD) para vacas da raça Holandesa, nas concentrações do macrominerais no sangue. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2001, Piracicaba. *Anais...* Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001. v.38, p.1311-1312.

SETTI, M. C.; SCHALCH, E.; ZANETTI, M. A. Estudo do balanço cation-aniônico da dieta no desempenho de vacas holandesas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 27, n. 6, p. 1241-1247, 1998.

SIMESSEN, M. G.; NANSEN, P. Serum gama glutamiltranspeptidase (GGT) and aspartate-aminotransferase (AST) activities in adult cattle with chronic *Fasciola hepatica* infection. *Acta Veterinária Scandinavica*, Copenhagen, v.15, p. 239-43, 1974.

STEVENSON, M.A. LEAN, I.J. Descriptive epidemiological study on culling and deaths in eight dairy herds. *Australian Veterinary Journal*, Brunswick, n.76, p.482-488, 1998.

THILSING-HANSEN, T.; JORGENSEN, R. J.; ENEMARK, J. M.; LARSEN, T.. The effect of zeolite a supplementation in the dry period on periparturient calcium, phosphorus and magnesium homeostasis. *Journal of dairy Science*, Champaign, v.85, p.1855-1862, 2002.

UNGLAUB, W.; AFSCHAR, A.; MARX, D. Die Aktivität der GGT (gamma-glutayltranspeptidase) im Serum des Rindes. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, Hannover, v. 80, p.1 31-34, 1973.

VAN DE BRAAK, A. E.; VAN'T KLOSSTER, A. T.; MALESTEIN, A. Influence of a deficient supply of magnesium during the dry period on the rate of calcium

mobilization by dairy cows at parturition. *Research in Veterinary Science*, London, v. 42, p. 101-108, 1987.

WANG, C.; VÉLEZ, J.S.; RISCO, C.A. Avanços recentes na prevenção da paresia do parto nas vacas leiteiras. *Compêndio de educação continuada*, São Paulo, v. 1, n.1, p. 63-67, 1996.

WESTERHUIS, J. H. De preventie van melkziekte door voedingsmaatregelen bij kalvende koeien met een melkziekte geschiedenis. *Tijdschr-Diergeneeskd*, Hannover, v. 100, p. 213-220, 1975.

WILSON, G. F. Development of a novel concept (calcigard) for activation of calcium absorption capacity and prevention of milk fever. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Kobenhavn, v. 97, p.77-82, 2003.

ZEPERITZ, H.; JAHREIS, G.; KIUPEL, H.; HESSE, V. The effects of intramuscularly administered vitamin D₃, 25- and 1 α -hydroxycholecalciferol on mineral deposits in soft tissues. *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, Berlin, v.38, p.763-769, 1991.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar variáveis bioquímicas sanguíneas em vacas leiteiras no período do periparto que possam auxiliar para um diagnóstico precoce da hipocalcemia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar cálcio, fósforo e magnésio sanguíneos na busca de se obter valores de referência e as possíveis alterações desses valores em vacas leiteiras que apresentem ou não o quadro de hipocalcemia no período do periparto;
- Reconhecer possíveis alterações nos valores sorológicos da fosfatase alcalina, aspartato-aminotransferase e gama-glutamilttransferase em vacas no período de periparto que apresentem ou não hipocalcemia;
- Estabelecer valores de referência da β -endorfina presente no soro sanguíneo dos bovinos;
- Investigar se a β -endorfina demonstra seus valores alterados em vacas no período do periparto que apresentem ou não hipocalcemia;
- Avaliar a curva da β -endorfina em vacas que apresentaram hipocalcemia clínica.

3. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

3.1 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA SOROLÓGICA DO METABOLISMO MINERAL DE BOVINOS LEITEIROS NO PERIPARTO

Avaliação Bioquímica Sorológica do Metabolismo Mineral de Bovinos Leiteiros no Periparto

Iara de Oliveira Buture¹

Resumo: A hipocalcemia da vaca parturiente é um distúrbio metabólico que ocorre em vacas leiteiras de alta produção durante o periparto causando sinais de debilidade muscular (geralmente com o animal alerta), excitabilidade, tremores musculares, prostração, decúbito inicialmente esternal que evolui para lateral, entre outras alterações. Essa doença causa grandes perdas econômicas à agropecuária leiteira, uma vez que resulta na diminuição da produção de leite e perda de peso corpóreo, além de diminuir a vida produtiva das vacas acometidas. A fim de minimizar prejuízos na produção leiteira procuramos alterações bioquímicas em cálcio, fósforo e magnésio sanguíneos no periparto de vacas leiteiras que sirvam como parâmetros para diagnóstico precoce da hipocalcemia diminuindo sua incidência

Palavras-chave: Hipocalcemia, Vaca parturiente, Cálcio, Fósforo, Magnésio.

Biochemical sorological evaluation of mineral metabolism of dairy bovines in periparto.

Abstract

The hipocalcemia in the parturient cow is a metabolic disturb that occurs in dairy cows of high production during the periparto causing signs of muscular debilities (in general with the animal aware), excitability, muscular shake, prostration, lying initially external with evolution to lateral, among other alterations. This illness causes great economic losses to the dairy cattle breeding since it results in decreasing of milk production and animal weight lost, and besides it diminishes the productive life of the attacked cows. In order to minimize damages in dairy production we look for biochemical alterations in calcium, phosphorus and magnesium in the periparto of dairy cows to be used as parameters for hipocalcemia precocious diagnostic, lessening its incidence.

Keywords: Hipocalcemia, dairy cows, parturient cow, calcium, phosphorus, magnesium. treatment, prophylaxy.

¹ Doutoranda em Ciência Animal Área de Concentração: Sanidade Animal da Universidade Estadual de Londrina.

INTRODUÇÃO

Distúrbios na concentração de cálcio podem levar uma vaca a perder a capacidade de se levantar momentaneamente ou não, concentrações baixas de Ca no sangue, que é essencial para que possa ocorrer a sincronia dos movimentos, fazem com que o animal fique impossibilitado de se levantar. Normalmente este distúrbio ocorre em vacas no período do periparto, ainda segundo (GOFF, 2008), a hipocalcemia aumenta a susceptibilidade a outras doenças metabólicas e infecciosas.

O organismo animal consegue controlar a concentração normal de Ca no sangue na maior parte do tempo, ainda segundo (HORST; GOFF; MCCLUSKEY, 2003), mas ocasionalmente ocorrem falhas nestes mecanismos, que podem resultar na hipocalcemia da vaca leiteira. A hipocalcemia pode se apresentar na forma de hipocalcemia clínica ou sub-clínica, sendo que nas duas formas segundo (KIMURA; REINHARDT; GOFF, 2006) elas reduzem de forma significativa a produtividade de leite da vaca afetada pela enfermidade.

A hipocalcemia destaca-se entre uma das principais enfermidades observadas em vacas leiteiras. A hipocalcemia é um distúrbio metabólico que costuma acometer estes animais imediatamente após o parto. Também conhecida como paresia puerperal ou paresia do pós-parto, comenta (CORBELLINI, 1998) que a hipocalcemia da vaca leiteira é uma doença metabólico-nutricional das mesmas e que ocorre principalmente no período de 48 horas antes á 72 horas pós-parto.

A doença é caracterizada pelo desequilíbrio súbito na regulação do cálcio, cursando com debilidade muscular e paresia, geralmente com o animal alerta (BOUDA; QUEIROS-ROCHA; GONZALEZ, 2000), a enfermidade pode ser causada por alimentação com dieta rica em cálcio e potássio (especialmente nas duas semanas anteriores ao parto); com a relação cálcio e fósforo ($\text{Ca}^+ : \text{P}^+$) inadequada, ou também por alteração nos mecanismos reguladores de cálcio sérico. Estudos demonstram que a hipomagnesemia afeta o metabolismo do Ca através da redução da produção do paratormônio (LITTLEDIKE; HORST, 1982), também reduz a sensibilidade dos tecidos ao Paratormônio (RUDE, 1998). O desequilíbrio na regulação no Ca^+ pode ocorrer pela diminuição da atividade da glândula paratireóide

e conseqüente diminuição da secreção de hormônio PTH no periparto, causada por sobrecarga nutricional com Ca^+ antes do parto. No pós-parto ocorre uma grande perda de Ca^+ sérico para o colostro o qual, juntamente com a diminuição da atividade da paratireóide, resulta em queda brusca em sua concentração plasmática que suplanta a capacidade de adaptação orgânica do animal, desencadeando assim um quadro clínico de hipocalcemia. Outro fator também importante no desencadeamento da hipocalcemia, seria a diminuição da absorção intestinal de Ca^+ nos primeiros três dias pós-parto (BOUDA; QUEIROS-ROCHA; GONZALEZ, 2000) e a deficiência de Mg^+ durante o período fora de lactação (COBERLLINI, 1998).

Vacas leiteiras com hipocalcemia apresentam diminuição do apetite, baixa produção de leite e diminuição dos movimentos do rúmen, segundo (KIMURA; REINHARDT; GOFF, 2006). Os animais que desenvolvem hipocalcemia, geralmente, apresentam sinais que se iniciam com excitação, tremores musculares, anorexia, ataxia e debilidade geral. Os sinais evoluem para prostração e decúbito esternal com paresia, perda de sensibilidade progressiva das extremidades pélvicas até a cabeça, depressão e sonolência, extremidades frias, ausência de movimentos ruminais, retenção de urina, constipação. (BOUDA; QUEIROS-ROCHA; GONZALEZ, 2000) comentam ainda que a retenção placentária é frequente e caso o animal não seja tratado observa-se decúbito lateral e coma que é caracterizado por flacidez muscular, batimentos cardíacos débeis e irregulares, frequência respiratória e temperatura corpórea diminuídas, além de timpanismo.

O diagnóstico normalmente é feito com base na história clínica, com início repentino dos sinais nas primeiras 24 horas até três dias após o parto, mais os dados do exame físico e constatação de concentração sérica de Ca^+ diminuída ($<1,6$ mmol/L ou 4 mg/100ml) (BOUDA; QUEIROS-ROCHA; GONZALEZ, 2000). No diagnóstico diferencial, devem ser incluídas as enfermidades toxêmicas graves, causadas por mastite flegmonosa ou por peritonite, hipomagnesemia, acidose ruminal e problemas de bexiga que resultem em decúbito. Segundo Palhano (2001), o quadro de hipocalcemia da vaca parturiente pode ser confundido com o de cetose, que pode ocorrer alguns meses após a lactação devido a balanço energético negativo.

Estudos realizados, segundo Horst, Goff e McCluskey (2003), demonstram que levantamento nos USA, sugerem que cerca de 5% das vacas leiteiras desenvolvem a hipocalcemia da vaca leiteira. Em pesquisa realizada no

Brasil foi encontrada a incidência de 4,25 % de casos de hipocalcemia da vaca leiteira, ainda segundo Ortolani (1995), a letalidade pode chegar próxima de 12,8%.

Aproximadamente 20 milhões de dólares são gastos anualmente no tratamento e controle da hipocalcemia, sendo a metade desse valor gasto com medicamentos. Outro prejuízo constatado é na produção leiteira, já que as vacas reduzem em cerca de 60kg sua produção e perdem por volta de 15kg de peso corpóreo, além de terem sua vida produtiva diminuída e serem descartadas precocemente. Outro fator a se considerar é o fato de que vacas com hipocalcemia tenham seis vezes mais chance de desenvolverem mastite do que as vacas sem o problema, além de terem maior incidência de retenção de placenta, deslocamento de abomaso e paralisia nervosa (CASTRO, 2003). Ainda segundo o autor, todas estas enfermidades estão inter associadas e basta que a hipocalcemia ocorra para a susceptibilidade às outras doenças ocorrerem também. A incidência média desta enfermidade é de 5% a 6%, mas estima-se que 50% das vacas apresentam hipocalcemia sub-clínica após o parto. (HORST; GOFF; MCCLUSKEY, 2003) também comentam que levantamento nos USA sugerem que cerca de 5% das vacas leiteiras apresentam hipocalcemia clínica no período do periparto e 50% das vacas mais velhas apresentam hipocalcemia sub-clínica. Estas vacas hipocalcêmicas estariam susceptíveis às outras doenças pós-parto. Pesquisas da Universidade de Cornell, EUA, mostram que vacas que apresentam hipocalcemia são 23,6 vezes mais propensas a desenvolver problemas de cetose e quatro vezes mais propensas a apresentar retenção de placenta. Segundo (KIMURA; REINHARDT; GOFF, 2006), a hipocalcemia aumenta os riscos das vacas que apresentam a enfermidade em apresentarem outras patologias como deslocamento de abomaso e mastite.

Estudos demonstraram que vacas em produção e com dietas contendo altos teores de energia no início do pós-parto são submetidas por menor tempo à ação bloqueadora dos opióides endógenos sobre a secreção de LH. Assim, voltam a ciclar mais rapidamente, quando comparadas àquelas que recebem dietas com baixos teores de energia no início do pós-parto, sugerindo que a recuperação pós-parto sofre influência da condição nutricional do animal (SINCLAIR; BROADBENT; HUTCHINSON, 1995).

Estudos estão sendo realizados para verificar a correlação entre o estresse e a intensidade da manifestação da hipocalcemia, sobretudo com o reconhecimento de indicadores biológicos, entre os quais os peptídeos opióides. No

período da gestação, segundo Marques (2001), ocorre um progressivo aumento dos peptídeos opióides endógenos, aumentando assim, as suas concentrações no plasma sanguíneo.

Segundo Sciorsi, Dell'Aquila e Minoia (2001), estudos demonstraram haver uma tendência em se acreditar que os peptídeos opióides endógenos fossem também responsáveis pelo desencadeamento da hipocalcemia da vaca leiteira.

O tratamento da hipocalcemia, assim como o seu diagnóstico, é simples e se baseia na administração de soluções de cálcio endovenoso, sempre com controle da frequência cardíaca através da auscultação (BOUDA; QUEIROS-ROCHA; GONZALEZ, 2000).

A diferença entre cátion e ânion (DCAD) absorvidos de uma determinada dieta determina o balanço do equilíbrio acidobásico e, portanto, o pH do sangue, podendo auxiliar na prevenção da hipocalcemia. O autor comenta ainda que, com exceção de K e Cl, as outras variáveis nas equações da DCAD podem ser mais ou menos estabelecidas em relações fixas (Degaris e Lean, 2008).

Tentando contribuir para a prevenção e controle da doença, diminuindo assim perdas e prejuízos na produção leiteira, procuramos avaliar variações da concentração sérica de cálcio, fósforo e magnésio em vacas leiteiras de alta produção no período de periparto e em vacas não prenhes.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos animais

Foram utilizadas 20 vacas de leite de alta produção, procedentes de granjas do sul do Paraná, da raça Holandesa Preta e Branca, sendo 10 vacas gestantes (G1) lactantes no sistema duas ordenhas/dia e 10 vacas não gestantes (G2) lactantes no sistema duas ordenhas/dia.

Os animais foram mantidos numa área de 12,0 hectares, divididos em seis piquetes com 2,0 hectares cada, separados por cerca eletrificada composta de 2 fios de arame, sendo o primeiro fio distante 0,45m do solo com espaçamento de 0,45m entre os fios. Os piquetes tinham um cocho d'água e um cocho coberto para suplementação mineral. Os animais ficaram alojados em piquetes formados por capim italiano, azevém e aveia, sendo estes suplementados com silagem de milho,

silagem de aveia, farelo de milho, suplemento concentrado por produção e sal mineral a vontade.

Os animais selecionados para o experimento foram desverminados, com produto de amplo espectro (ivermectina) no período que antecedeu o início do experimento. Além do vermífugo, os animais receberam doses de reforço contra aftosa e raiva.

O experimento teve uma duração de onze meses, sem período destinado à adaptação dos animais.

Colheita das amostras

As amostras de sangue dos animais do grupo G1 foram colhidas no 14° e 7° dias anteriores ao parto; no dia do parto, e no 7° e 14° dias após o parto. Com relação aos animais do grupo G2, foram colhidas duas amostras em dois diferentes dias escolhidos aleatoriamente, sendo a primeira colheita no início do experimento e a segunda, no final do experimento.

O sangue foi colhido através de venopunção jugular, foram utilizando-se agulhas descartáveis e tubos tipo *vacutainer* da marca BD de 10 ml.

O plasma foi obtido após centrifugação das amostras a 3000rpm durante 8 minutos, foi congelado e armazenado até o momento das análises laboratoriais, com o qual foram feitas as seguintes dosagens:

- Ca⁺ pelo método colorimétrico* (Kit Analisa);
- P⁺ pelo método colorimétrico Basques-Lustosa* (Kit Analisa);
- Mg⁺ pelo método colorimétrico* (Kit Analisa).

ANALISE ESTATÍSTICA .

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos e 10 repetições.

Os dados foram submetidos a análise de variância para avaliar as

diferenças entre os grupos gestantes e não gestantes.

Para o grupo G1 (vacas gestantes), foi realizada análise de regressão dos parâmetros estudados em função dos dias de avaliação em relação ao dia do parto.

Foram também realizadas análises de correlação entre parâmetros estudados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO.

Estão apresentadas na Tabela 1 as médias observadas de Ca, P e Mg e erros-padrão das médias de acordo com os dois grupos estudados. Pode-se observar que as médias de todas as avaliações das vacas gestantes (grupo G1) foram menores ($P < 0,05$) para Ca e P e maiores ($P < 0,05$) para Mg em relação as vacas do grupo G2 (não-gestantes).

Tabela 1. – Médias observadas em mg/dL, e erros padrão das médias (entre parênteses) das variáveis Ca, P e Mg para os grupos G1(gestante) e G2(não-gestante).

Grupos	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Mg (mg/dL)
Gestantes -G1	8,72 (0,20) b	7,75 (0,29) b	2,80 (0,09) a
Não-gestantes -G2	9,56 (0,18) a	10,47 (0,28) a	2,28 (0,04) b
Média geral	8,96	8,53	2,65
Coefficiente de Variação %	16,76	20,12	15,43

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade.

Ao se analisar apenas os dados coletados nos dias -7 antes do parto e dia 0 (dia do parto) para o grupo G1 (gestante) em comparação com os dados do grupo G2 (não-gestante), obteve-se as médias apresentadas na Tabela 2. Pode-se observar comportamento similar ao observado na Tabela 1 quando se utilizou todos os dados do grupo G1 (todos os dias de avaliação). Os valores encontrados para o

grupo G1 foram inferiores aos encontrados para o grupo G2, sugerindo que ocorre uma alta demanda de Ca e P no periparto, e que o Ca e o P se encontram menos disponíveis para este grupo de animais.

Tabela 2. – Médias observadas, em mg/dL, das variáveis Ca, P e Mg para os grupos G1(gestante) nos dias -7 e 0 (dia do parto) e não-gestantes grupo G2 (não gestantes).

Grupos	Ca	P	Mg
Gestantes -G1	8,22 b	6,82 b	2,89 a
Não-gestantes -G2	9,56 a	9,56 a	2,28 b
Média geral	8,89	8,89	2,58
Coeficiente de Variação %	16,76	16,76	15,43

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si, significativamente ao nível de 5% de probabilidade.

Na Tabela 3 são apresentadas as medias observadas e os erros padrão das médias, para os diferentes dias de avaliação realizadas no grupo G1 (vacas gestantes). Para o Ca e para o P pode-se observar que os menores valores de Ca e P, respectivamente, 6,79mg/dL e 6,15mg/dL, foram encontrados no dia 0 (dia do parto). O Mg mostrou o oposto com o maior valor (2,96mg/dL) sendo obtido no dia 0 (dia do parto).

Tabela 3.– Médias observadas, em mg/dL, e erros padrão das médias (entre parênteses) de Ca, P, Mg, para os animais do grupo G1 de acordo com os dias de avaliação.

Dias de avaliação	Ca	P	Mg
-14	9,62 (0,22)	8,38(0,14)	2,84(0,33)
-7	9,66(0,23)	7,50(0,43)	2,82(0,15)
0	6,79(0,53)	6,15(0,80)	2,96(0,19)
+7	8,51(0,26)	7,87(0,63)	2,60(0,12)
+14	9,01(0,27)	8,87(0,62)	2,78(0,17)
Média Geral	8,89	8,71	2,71
Coeficiente de Variação (%)	16,76	18,43	15,43

A análise de regressão dos dados de cálcio mostrou efeito quadrático ($Y=7,93057 - 0,0337143X + 0,00803499X^2$, $R^2=0,49$) em função dos dias de avaliação, com menor média ajustada (ponto de mínimo 7,89mg/dL) sendo obtida para o dia 2 após o parto (Figura 1). Os valores de referência máximo (10,50mg/dL) e mínimo (8,50mg/dL) obtidos na literatura também são apresentados na figura. Observa-se que a partir do dia -6 até o dia 10 após o parto, os valores médios de Ca foram inferiores ao valor mínimo de referência.

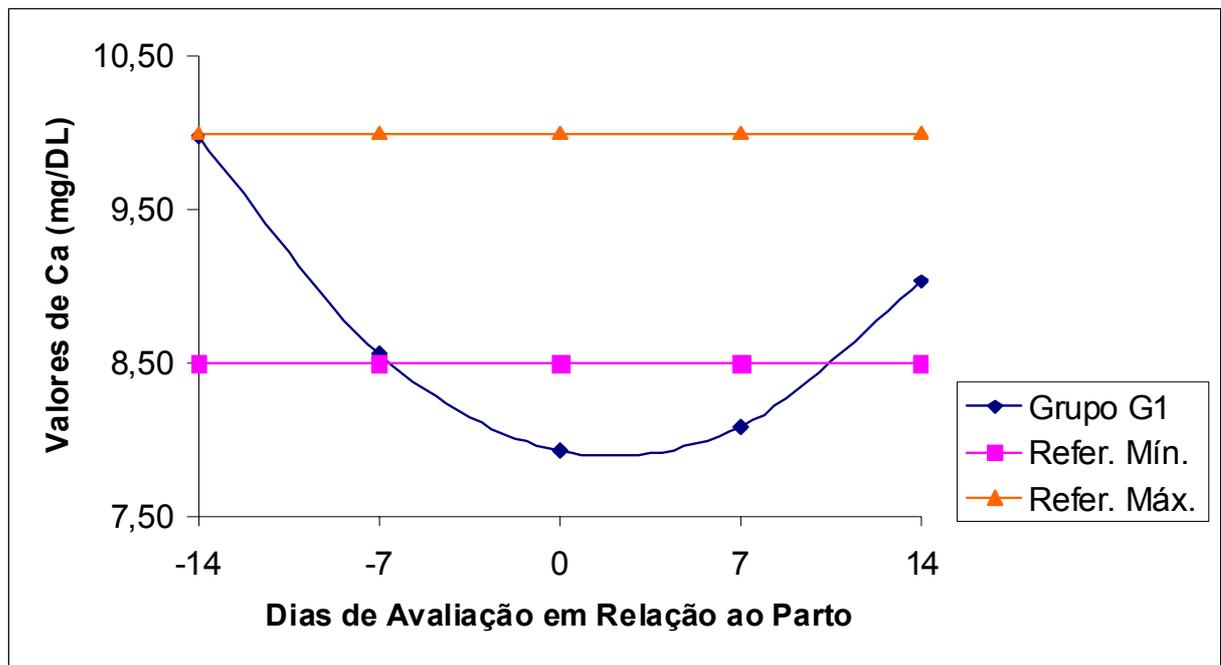


Figura 1. Valores ajustados de Cálcio em função dos dias de avaliação.

Para fósforo também foi observado (Figura 2) efeito quadrático ($Y=6,77829 - 0,0192857X + 0,00995627X^2$, $R^2=0,82$), com menor valor (valor mínimo 6,15mg/dL) sendo obtido para o dia 1 após o parto. Os valores de referência mínimo (5,65 mg/dL) e máximo (6,65mg/dL) citados na literatura também podem ser vistos na figura. Embora os valores de fósforo para este grupo de animais tenham se mostrado acima dos valores de referência citados pela literatura, pode ser observado o declínio dos valores de fósforo à medida que o parto se aproxima, voltando a subir após o parto, se aproximando do valor obtido inicialmente.

Para magnésio não foi observado efeito de regressão em função dos dias de avaliação.

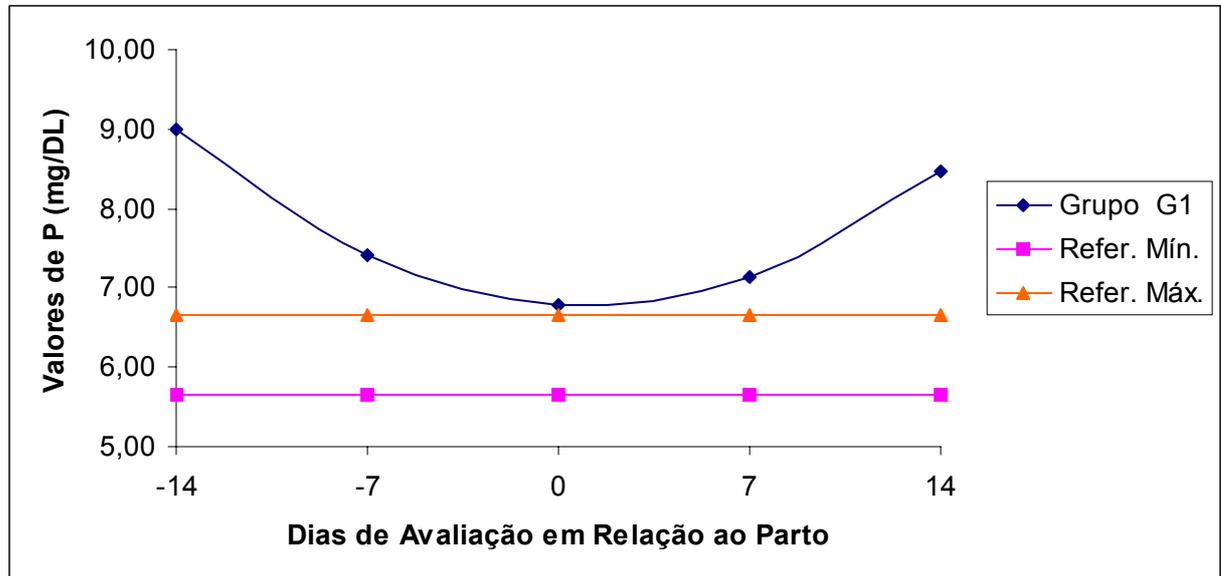


Figura 2. Valores ajustados de fósforo em função dos dias de avaliação em relação ao parto.

Foi observado durante o experimento que uma das vacas (animal 009), que integrava o grupo G1 (gestante) apresentou hipocalcemia clínica, com toda sintomatologia característica inclusive decubito lateral. A vaca com hipocalcemia (animal 009) foi tratada após o nascimento do bezerro, quando já estava em decúbito lateral, com borogluconato de cálcio por via intravenosa, apresentando resposta imediata ao medicamento, se levantando algum tempo depois da aplicação do medicamento.

Os dados obtidos deste animal em comparação com as médias o grupo G1 (gestante) e grupo G2 (não-gestante), são apresentados na figura 3.

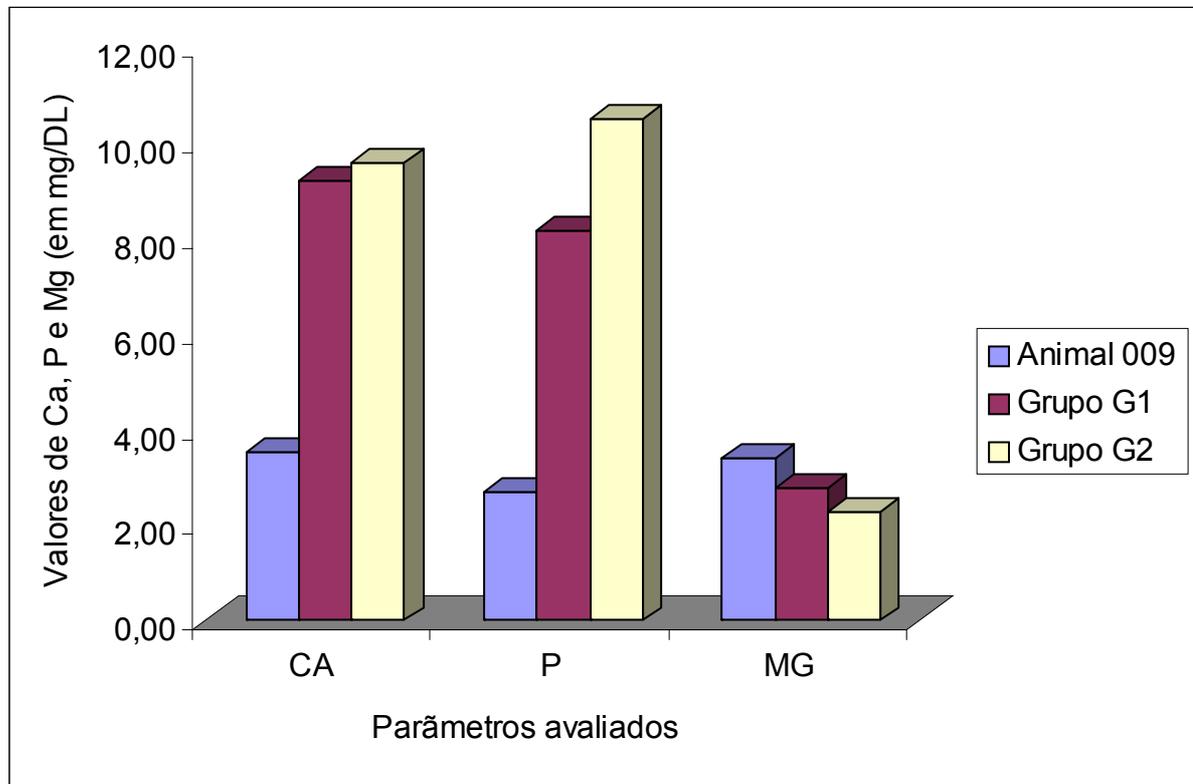


Figura 3. Valores de Ca, P e Mg para os diferentes grupos e para o animal com hipocalcemia clínica (animal 009).

Observa-se que o animal que apresentou a enfermidade (animal 009) apresentou níveis de Ca e de P bem abaixo da média dos grupos G1 (gestantes) e G2 (não-gestantes), e que já em relação ao Mg apresentou um pequeno aumento, indicando que animais com hipocalcemia tem baixos valores sanguíneos de Ca e P à disposição e que o paratormônio em animais com a enfermidade não consegue mobilizar cálcio suficiente para a demanda necessária na hora do parto.

Nas Figuras 4 e 5 são apresentados, respectivamente, os comportamentos dos valores de Ca e P, para os dados do grupo G1 (gestante), valores de referência, máximo e mínimo para bovinos, encontrados na literatura e os valores observados para o animal que apresentou a enfermidade (animal 009).

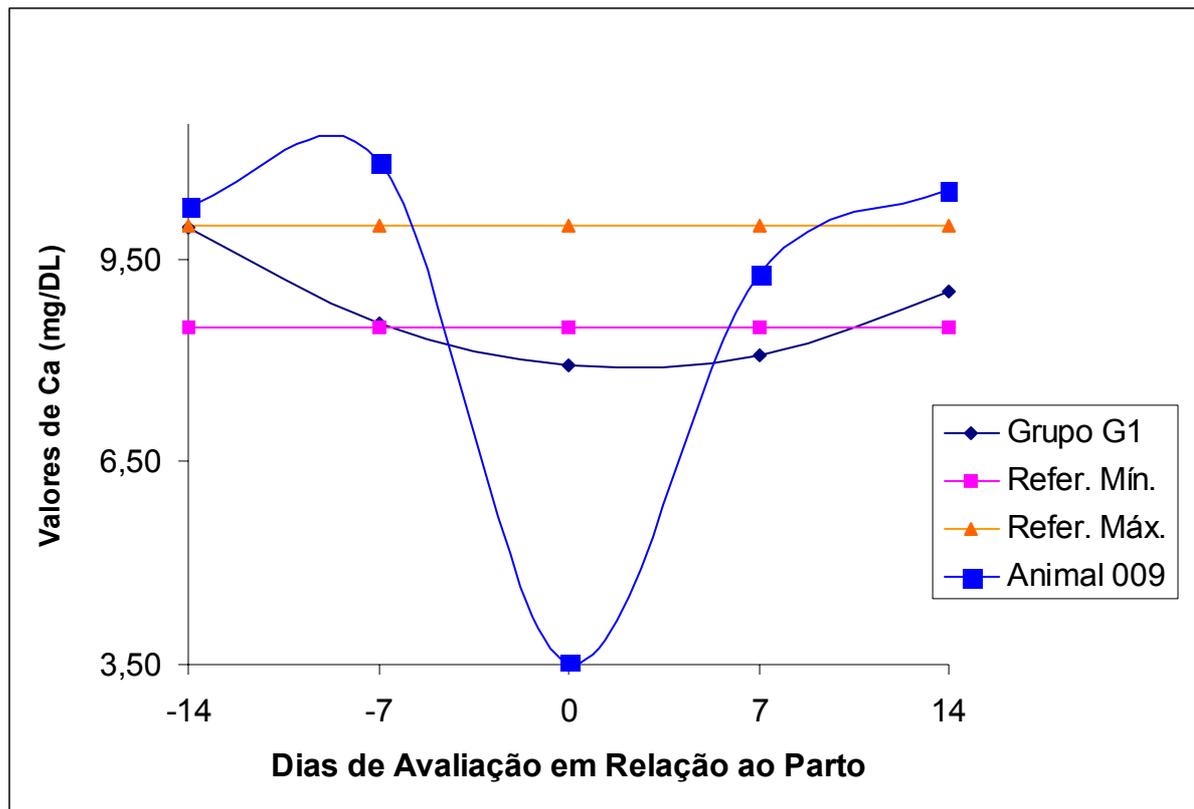


Figura 4. Valores de cálcio em função dos dias de avaliação em relação ao parto.

Pode-se observar na Figura 4 que o grupo G1 apresentou diminuição gradativa e constante dos valores de Ca a medida que se aproximava o dia do parto, atingindo seu menor valor (7,89mg/dL) no dia 2 após o parto, após o qual os valores de Ca voltaram a aumentar. Em relação ao animal que apresentou hipocalcemia (animal 009) pode-se observar que os valores de Ca diminuíram de forma brusca aproximadamente no dia -5 antes do parto até o dia do parto (3,50mg/dL), voltando próximo aos valores normais após o parto.

A recuperação rápida provavelmente ocorreu porque este animal (009), foi medicado com borogluconato de cálcio por via intravenosa, o que deve ter favorecido a recuperação do animal.

Na Figura 5. pode-se observar como a diminuição do P do grupo G1 é discreta quando comparada com a diminuição acentuada que ocorre nos valores encontrados para o P obtido da vaca (animal 009) que apresentou hipocalcemia clínica.

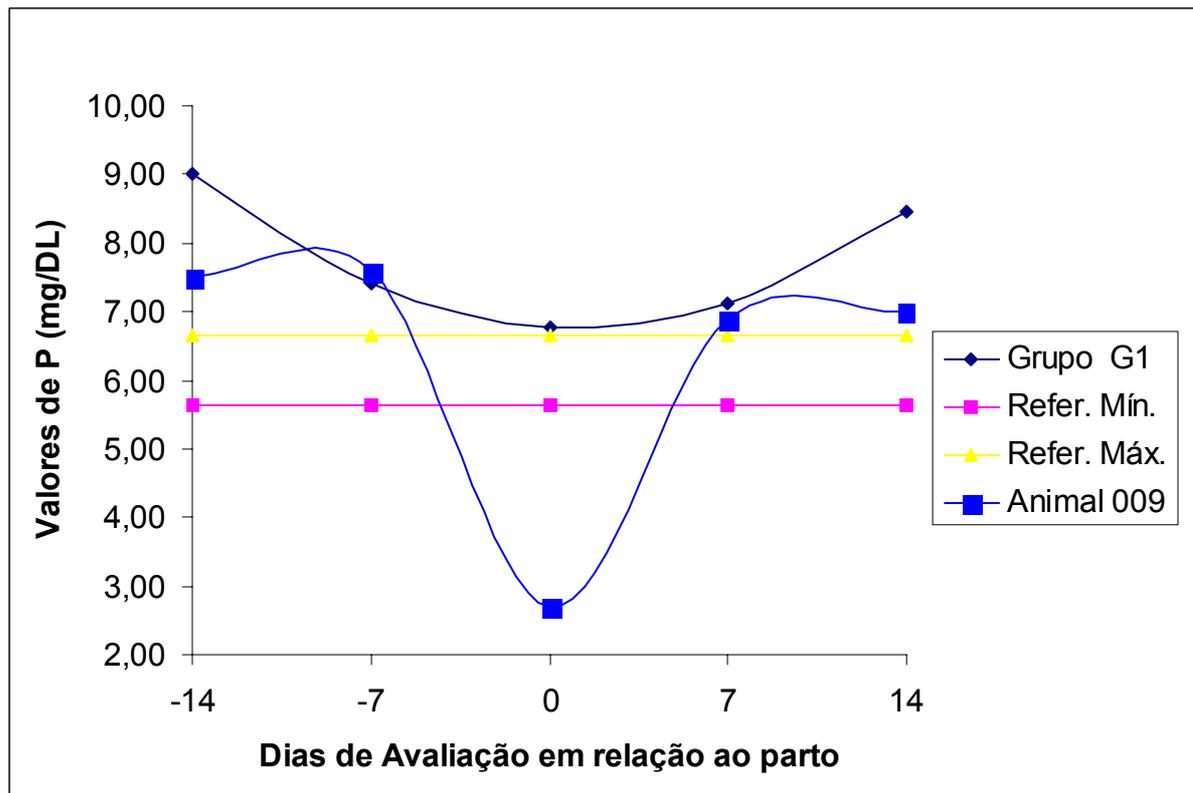


Figura 5. Níveis de fósforo em função dos dias de avaliação em relação ao parto.

O resultado do estudo das correlações entre estes parâmetros é apresentado na Tabela 4 para cada grupo avaliado G1(gestante) e G2(não-gestante).

Tabela 4. – Correlação entre Ca, P e Mg obtidas para o grupo G1(gestantes) nos dias -7 antes do parto e no dia 0 (dia/ parto) e grupo G2 (não gestantes).

Variáveis	Animais/ grupo	P	Mg
Ca	G1	0,47*	-0,37*
	G2	-0,28NS	-0,23 NS
P	G1	-	-0,41*
	G2	-	-0,25 NS

* Significativo a 5%.

NS Não significativo.

Para estes dados foram significativas as correlações entre Ca e P($r= 0,47$), Ca e Mg ($r= -0,37$), P e Mg ($r= -0,41$), apenas para o grupo G1, indicando que a redução do Ca está associada à uma redução do P em 47% das vezes é baixa e

que os valores de Mg foram inversamente relacionados aos valores de Ca e P. Para o grupo G2 não foram observadas correlações entre nenhuma das variáveis.

O animal 009 que apresentou o quadro clínico da hipocalcemia da vaca leiteira e apresentou mg/dL de Ca^+ sanguíneo, condiz com os valores citados por (Bouda, Queiroz-Rocha e Gonzalez, 2000) que comentam que o diagnóstico laboratorial da hipocalcemia da vaca leiteira pode ser confirmado quando a concentração sérica do Ca^+ é menor que 4mg/dL.

Observando as variações nas concentrações de Ca^+ deduz-se que foram condizentes com o descrito por (Degaris e Lean, 2008), e esta observação, somada às variações na concentração de P^+ e Mg^+ , demonstraram haver desequilíbrio nos minerais envolvidos no balanço do Ca^+ sérico nos animais de alta produção leiteira empregados no trabalho. Considerando as causas citadas por (Goff, 2008), como dietas desbalanceadas, para tais desequilíbrios, pode-se concluir que elas são decorrentes de desequilíbrios nutricionais associados a altos níveis de exigência determinados pela elevada produção leiteira.

Os valores encontrados para Ca^+ para o grupo G1 (gestantes) nos dias do parto e 7 dias após o parto demonstram a baixa concentração de Ca^+ quando comparados aos valores de referências. O valor verificado para o animal 009 no dia do parto (3,52 mg/dL), é um valor de cálcio considerado por (Rebhun, 1999) como valores encontrados em bovinos comatosos em decúbito lateral.

Os valores de P^+ sanguíneo do grupo G1 quando comparados com os valores encontrados para o grupo G2 se apresentaram diminuídos. Indicando que as vacas leiteiras no período do periparto não conseguem mobilizar Ca^+ e P^+ suficiente para manutenção do organismo, podendo predispor o animal a hipocalcemia da vaca leiteira.

O Mg^+ , não apresentou efeitos significativos na determinação da hipocalcemia da vaca leiteira, quando os valores encontrados para o grupo G1 (gestante) foram comparados com os valores encontrados para o grupo G2 (não gestante).

Os estudos demonstraram a importância de monitoramento através da aferição das concentrações séricas de Ca^+ , P^+ e Mg^+ , considerando que vacas leiteiras saudáveis podem vir a desenvolver hipocalcemia puerperal. Desta forma, a constatação precoce de alterações nos valores dessas concentrações séricas

permite a correção dos fatores predisponentes e desencadeantes para o desenvolvimento da doença, evitando assim as perdas econômicas relacionadas a hipocalcemia da vaca leiteira.

CONCLUSÃO

Na intenção de diminuir as perdas econômicas geradas pela hipocalcemia da vaca leiteira, devem-se estudar as variações de P^+ , Ca^+ e Mg^+ séricos durante o parto. Tais estudos devem ser realizados através de mensurações laboratoriais, na intenção de conhecer a curva de variação desses elementos. Dessa forma, podem ser implantados na propriedade programas de controle preventivo e curativo da hipocalcemia da vaca leiteira.

REFERÊNCIAS

BOUDA, J.; QUEIROS-ROCHA, G.; GONZALEZ, F. H. D. Desequilíbrio de Cálcio Fósforo e Magnésio. In: GONZALEZ, F. H. D.; GORGES, J.B.; CECIM, M. (Ed.). *Uso de provas de campo e de laboratório clínico em doenças metabólicas e ruminais dos bovinos*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. p. 47-52.

CAMPOS NETO, O.; MARÇAL W. S. Os fosfatos na nutrição mineral de ruminantes. *Revista dos Criadores*, São Paulo, n.793, p.8- 10, 1996.

CASTRO, A. L. Febre do leite: uma doença que deve ser tratada nos estágios iniciais. *Veterinary News*, New York, n. 64, p. 11, 2003.

CORBELLINI, C. N. Etiopatogenia e controle da hipocalcemia e hipomagnesemia em vacas leiteiras, Porto Alegre, 1998. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE DEFICIÊNCIA MINERAIS EM RUMINANTES. *Anais...* Porto Alegre: UFRGS, 1998.

DEGARIS, D. J.; LEAN, J. J. Milk fever in dairy cows: a review of pathophysiology and control principles. *The Veterinary Research*, New York, n.8, p.168, 2008

GOFF, J. P. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *The veterinary Journal*, London, v.176, p.50-57, 2008.

HORST, R. L. GOFF, J. P. MCCLUSKEY, B. J. Prevalence of subclinical hypocalcemia in US dairy operations. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 86, (suppl. 1), p. 247, 2003.

KIMURA, K.; REINHARDT, T. A.; GOFF, J. P. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.89, p.2588-2595, 2006.

LITTLEDIKE, E. T.; HORST, R. L. Vitamin D3 toxicity in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.65, p.749-759, 1982.

MARÇAL, W.S. *Valores sangüíneos de bovinos nelore em pastejo de Brachiaria decumbens, suplementados com sal mineral naturalmente contaminado por chumbo*. 1996. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MARQUES, L. C. *Doenças metabólicas na vaca leiteira*. 2001. Monografia (Especialização em Medicina dos Animais de Produção) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ORTOLANI, E. L. Aspectos clínicos, epidemiológicos e terapêuticos da hipocalcemia de vacas leiteiras. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 47, n. 6, p. 799-808, 1995.

PALHANO, H. B. Hipocalcemia: um problema que afeta vacas e cabras leiteiras, ovelhas e cadelas. *Veterinary News*, New York, n. 52, p. 4-5, 2001.

ROSSATO, W. L. *Condição metabólica no pós-parto em vacas leiteiras de um rebanho do Rio Grande do Sul*. 2000. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RUDE, R. K. Magnesium deficiency: a cause of heterogeneous disease in humans. *Journal of Bone and Mineral Research*, Washington, v.13, p. 749-758, 1998.

SCIORSCI, R. L.; DELL'AQUILA, M. E.; MINOIA, P. Effects of naloxone on calcium turnover in cows affected by milk fever. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.84, p. 1627-1631, 2001.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, Washington, v. 30, p. 507-512, 1974.

SINCLAIR, K. D.; BROADBENT, P. J. ; HUTCHINSON, J. S. M. Naloxone evokes a nutritionally dependent LH response in post partum beef cows but not in mid-luteal phase maiden heifers. *Animal Science*, Penicuik, v. 61, p. 219-230, 1995.

**3.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SÉRICA DA ASPARTATO-AMINOTRANSFERASE,
FOSFATASE-ALCALINA, GAMA-GLUTAMILTRANSFERASE E VALORES SÉRICOS DE
CÁLCIO.**

Avaliação da atividade sérica da aspartato-aminotransferase, fosfatase-alcalina, glutamiltransferase e valores séricos de cálcio no periparto.

Iara de Oliveira Buture²

Resumo:

Perdas econômicas na bovinocultura de leite são observadas frequentemente associadas a hipocalcemia da vaca leiteira (HVL), enfermidade associada a diminuição de cálcio sanguíneo. Com o objetivo de relacionar a baixa concentração de cálcio no sangue a valores encontrados para estabelecer a função hepática e de estabelecer os valores de referência de parâmetros bioquímicos que avaliem a função hepática, por meio da determinação da atividade enzimática da aspartato-aminotransferase (AST), da fosfatase alcalina (FA) e da gama-glutamiltransferase (GGT), em vacas leiteiras, criadas na região Sul do Estado do Paraná, bem como avaliar possíveis alterações destes valores nos períodos de pré-parto, parto e pós-parto e também quando na presença da hipocalcemia da vaca leiteira sobre os referidos parâmetros bioquímicos, foram colhidas e examinadas amostras de soro sanguíneo de 20 vacas leiteiras de alta produção. A avaliação dos resultados levou em conta o período gestacional ou pós-parto em que se encontra a vaca leiteira no momento da colheita da amostra de sangue do animal, para observar se houve ou não influência dos períodos referentes ao parto sobre as transaminases, através das análises dos teores da AST, da fosfatase alcalina FA, da GGT e de cálcio das amostras.

Palavras-Chave: Vaca leiteira, hipocalcemia, função hepática, parâmetro bioquímico, aspartato-aminotransferase, da fosfatase alcalina, da gama-glutamiltransferase, cálcio, tratamento, profilaxia.

Abstract:

This causes economic losses by decreasing milk production in the hipocalcemia in dairy cows. Aiming to establish the reference figures for biochemical parameters that appraises the hepatic function, through determining enzymatic activity of AST; ALP, and GGT, in dairy cows raised in South region, Parana State, as well as to evaluate possible alterations, of these figures in pre-calving periods, calving and post-calving and also when in presence of Hipocalcemia in dairy cow on the referred biochemical parameters. Blood serum samples of 20 high production dairy cows were taken and tested. An evaluation of the results will take account of the pregnancy period or post-calving in which the dairy cow is when the blood sample is taken from the animal, to observe if there was influence from the periods referent to the calving over the transaminase, through the analyses of the amino transferase AST; of the fosfatase alcalina, ALP of gamagluta-miltransferase GGT and of calcium of the samples.

Key words: dairy cows, hypocalcaemia, parturient cow, hepatic function, biochemical parameter, aspartate - aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyltransferase (GGT), calcium, treatment, prophylaxy.

² Doutoranda em Ciência Animal Área de Concentração: Sanidade Animal da Universidade Estadual de Londrina.

INTRODUÇÃO

A hipocalcemia da vaca leiteira está associada à diminuição do cálcio sanguíneo, esta enfermidade afeta rebanhos de alta produção, afetando as vacas e interferindo no ciclo produtivo e reprodutivo. Assim como o cálcio sanguíneo se mostra diminuído outros parâmetro bioquímicos podem se mostrar alterados influenciando no metabolismo do animal. A sintomatologia clínica das vacas com hipocalcemia são diminuição do apetite, baixa produção de leite e diminuição dos movimentos do rúmen, segundo (KIMURA; REINHARDT; GOFF, 2006).

Caracterizada pelo desequilíbrio súbito na regulação do cálcio, cursando com debilidade muscular e paresia (BOUDA; QUEIROS-ROCHA; GONZALEZ, 2000), a hipocalcemia pode ser causada por alimentação com dieta rica em cálcio e potássio (especialmente nas duas semanas anteriores ao parto); com a relação cálcio e fósforo (Ca^+ : P^+) inadequada, ou também por alteração nos mecanismos reguladores de cálcio sérico. Outro fator também importante no desencadeamento da hipocalcemia seria a diminuição da absorção intestinal de Ca^+ nos primeiros três dias pós-parto (BOUDA; QUEIROS-ROCHA; GONZALEZ, 2000).

Estudos para estabelecer os valores padrões da atividade enzimática no sangue de bovinos começaram a ser realizados na década de 50, com a divulgação dos resultados obtido por Cornelius et al. (1959) que determinaram a ocorrência de maior atividade enzimática sérica de AST (aspartato-aminotransferase) em vacas com idades entre 2 e 10 anos do que em bezerros com 7 a 27 dias de vida. No que se refere aos estudos da atividade enzimática sérica da GGT em bovinos, só na década de 70 é que se encontraram as primeiras citações sobre a atividade dessa enzima, com destaque as pesquisas de Simesen e Storm (1973) e Unglaub, Afschar e Marx (1973). Outros trabalhos relacionaram os valores bioquímicos séricos, de AST, GGT e FA, relacionados à avaliação da função hepática, procurando estabelecer valores de referência para os níveis séricos da atividade enzimática, Cornelius et al. (1959), Simesen e Storm (1973) e Unglaub, Afschar e Marx (1973).

Alguns fatores podem influenciar a atividade enzimática sérica da AST, FA (fosfatase alcalina) e da GGT, entre estes estão àqueles relacionados à espécie animal, à raça, à idade, ao sexo, ao sistema de criação e produção leiteira,

assim como as variações da atividade enzimática sérica que ocorrem em doenças ou parasitoses hepáticas. Simesen e Nansen (1974), Gregory (1995). Lopes e Ferreira Neto (1976) e Barros Filho (1995), consideraram haver maior atividade enzimática da AST em bovinos adultos, concordando com Oliveira (1967) que relatou que animais mais velhos apresentam maior atividade da AST.

Barros Filho (1995), comenta sobre a exceção feita ao grupo de bezerros com menos de 3 meses de idade, no qual observou que a atividade da GGT era consideravelmente maior, não observou influência de fatores etários sobre a atividade da GGT, relacionando os elevados valores observados em bezerros com menos de 3 meses à ingestão do colostro. A influência da ingestão do colostro sobre a atividade sérica da GGT de bezerros recém-nascidos já fora demonstrada por Bouda et al. (1980), que verificaram a ocorrência de um aumento da atividade sérica de GGT logo após a ingestão de colostro. Estudos sobre a influência dos fatores sexuais sobre a atividade enzimática sérica demonstram que nessas pesquisas não foram observadas diferenças da atividade enzimática da AST e da GGT entre machos e fêmeas (KANEKO, 1989; D'ANGELINO, 1991; BARROS FILHO, 1995).

Os valores de AST, FA e GGT foram mensurados e correlacionados a várias doenças dos bovinos, em vários trabalhos realizados por diferentes pesquisadores. Hagiwara, Mirandola e Benesi (1986), estudaram a correlação da leucose enzoótica dos bovinos com possíveis alterações nos valores de parâmetros bioquímicos que avaliem a função hepática, porém seus estudos demonstraram que a leucose parece não influenciar a atividade sérica da AST, FA e GGT, uma vez que ao realizarem estudos comparativos da constituição bioquímica do soro sanguíneo de gado leiteiro da raça Holandesa, não encontraram diferenças significativas entre valores determinados em grupos de animais constituídos por bovinos infectados pelo vírus da leucose dos bovinos e por animais não infectados, ou seja, sadios. Botelho, Nascimento e Silveira (1980), pesquisaram em relação aos valores de GGT encontrados em bovinos no abate. Oliszewski et al. (2002), estudaram possíveis mudanças na FA, LDH e AST em vacas leiteiras acometidas por mastite. Batavani; Mortaz e Dawoodi (2003), investigaram os parâmetros de AST em vacas com mastite e vacas sem mastite.

Várias são as enfermidades metabólicas que podem acometer as vacas leiteiras de alta produção. Entre as principais, destacam-se as seguintes: hipocalcemia da vaca parturiente, hipoglicemia da vaca leiteira, acidose láctica

ruminal, síndrome do animal caído, esteatose hepática e outras. O período de transição de quatro semanas antes e quatro semanas depois do parto, também conhecido como período do peri-parto, é caracterizado pelo crescimento do risco de enfermidades (STEVENSON; LEAN, 1998), sendo a hipocalcemia da vaca leiteira uma das enfermidades que mais gastos apresentam aos produtores de leite.

Segundo Horst, Goff e McCluskey (2003), estudos realizados, demonstraram que nos USA cerca de 5% das vacas leiteiras desenvolvem a hipocalcemia da vaca leiteira. Já em pesquisa realizada no Brasil, foi encontrada a incidência de 4,25 % de casos de hipocalcemia da vaca leiteira. Ainda segundo Ortolani (1995), e a letalidade pode chegar próxima de 12,8%. Aproximadamente US\$ 20 milhões de dólares são gastos anualmente no tratamento e controle da hipocalcemia, sendo a metade desse valor gasto com medicamentos. O prejuízo também é observado na produção leiteira, uma vez que as vacas reduzem sua produção em cerca de 60kg e perdem por volta de 15kg de peso corpóreo, diminuem sua vida produtiva e existe ainda o fato que vacas com HVL apresentam seis vezes mais chance de desenvolver mastite, que vacas sem o problema, além de terem maior incidência de retenção de placenta e deslocamento de abomaso, (Castro 2003). DeGaris e Lean (2008), comentam que o balanceamento das dietas pode favorecer o aparecimento da enfermidade. A diferença de partículas de cátion e ânion absorvidas da dieta determina o balanço geral do equilíbrio ácido-base e também o pH do sangue. Golf (2008) indica como tratamento da HVL a aplicação de Ca (borogluconato de cálcio) por via endovenosa e relata que as preparações comerciais contêm também magnésio, fósforo e glicose em suas fórmulas. O cálcio pode ser aplicado também por via subcutânea, apresentando maior variação na absorção. Segundo alguns pesquisadores, para melhor controle da hipocalcemia, uma dose deve ser administrada ao parir e outra dose deve 24h depois da primeira dose, Melendez et al. (2002).

A presente pesquisa teve por objetivo estudar e analisar os valores de parâmetros bioquímicos que avaliam a função hepática, analisando valores de referência da AST, FA e GGT de vacas leiteiras, criadas na região sul do Estado do Paraná e avaliar também a influência dos períodos pré-parto; do parto e do pós-parto, comparando-as com os valores obtidos em vacas em período não gestacional, avaliando-se o efeito do periparto sobre elas.

MATERIAL E MÉTODOS

O material foi colhido de bovinos de rebanhos leiteiros, negativos para tuberculose e brucelose, criados em sistema semi-intensivo, de acordo com o manejo tradicional empregado nas propriedades produtoras de leite tipo C na região sul do estado do Paraná.

Para a determinação dos valores de atividade enzimática da AST, FA, GGT e de Ca foram colhidas amostras de soro sanguíneo de 10 animais sadios do sexo feminino, gestantes e lactantes, constituindo o primeiro grupo experimental (G1). Um segundo grupo, constituído por 10 animais sadios do sexo feminino, não-gestantes e lactantes, constituiu o segundo grupo experimental (G2).

Os números de coletas da amostra de sangue foram diferentes para os dois grupos, sendo que no grupo G1 foram colhidas amostras aos -14 dias e -7 dias antes do parto, no dia do parto e +7 e +14 dias após o parto. No segundo grupo foram colhidas amostras duas vezes uma no início do experimento e outra, no último dia de coleta do experimento.

As amostras de sangue foram colhidas mediante punção da veia jugular externa, sem garroteamento excessivo do vaso, utilizando sistema Vacutainer, em tubos de vidro siliconizados. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente para facilitar a retração do coágulo e, a seguir, centrifugadas, com força de centrifugação igual a 1000X, durante 15 minutos, para a ocorrência de uma correta sinerese do coágulo, sendo o soro sanguíneo separado por aspiração e, em seguida, acondicionado em Ependorf e conservado em freezer a menos 20° C até a realização das análises laboratoriais.

O cálcio foi mensurado através do pelo método colorimétrico* (Kit Analisa).

A atividade enzimática sérica da AST foi determinada por meio de teste cinético UV, utilizando kit comercial Analisa, com leitura da atividade catalisadora efetuada em espectrofotômetro, com comprimento de ondas igual a 340nm, à temperatura de 25° C e os valores obtidos expressos em U/l, conforme preconizado pela Sociedade Alemã de Química Clínica - DGKC (1972) e Schmid e Forstner (1986).

As análises da atividade enzimática sérica de FA foram realizadas através de teste cinético colorimétrico, utilizando kit comercial Analisa, com leitura da atividade catalisadora em espectrofotômetro, à temperatura de 25° C, e os valores obtidos expressos em U/l, conforme recomendações de Schmid e Forstner (1986).

A atividade enzimática sérica da GGT foi determinada por meio de teste cinético colorimétrico, utilizando-se kit comercial Analisa, com leitura da atividade catalisadora efetuada em espectrofotômetro, com comprimento de ondas igual a 405nm, à temperatura de 25° C, e valores obtidos expressos em U/l, conforme recomendações de Persijn e Slik (1976) e Schmid e Forstner (1986).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos a análise de variância para avaliar as diferenças entre os grupos gestantes e não gestantes.

Em relação ao Ca, para o grupo G1 (vacas gestantes), foi realizada análise de regressão dos parâmetros estudados em função dos dias de avaliação em relação ao dia do parto. Foram também realizadas análises de correlação entre parâmetros estudados.

Os parâmetros estudados FA, GGT e AST, foram submetidos à transformação logarítmica visando normalizar a sua distribuição dos mesmos.

Foi também realizada análise de correlação entre os parâmetros estudados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentadas as médias U/L observadas e erros-padrão de acordo com os dois grupos (G1 animais gestantes e G2 não gestantes), estudados. Pode-se observar que as vacas gestantes (grupo G1), apresentaram menores médias de FA que os valores encontrados para as vacas não-gestantes (grupo G2) o mesmo ocorrendo com as médias de Ca.

Tabela 1. – Médias observadas e erros padrão das médias (entre parenteses) das variáveis FA, GGT, AST (em U/L) e Ca (em mg/dL) para os grupos G1(gestante) e G2 (não-gestante).

Grupos	FA	GGT	AST	Ca
Grupo G1	122,04(16,83)b	88,66(14,45)	107,42(9,98)	8,72 (0,20) b
Grupo G2	188,01(19,98)a	97,70(22,98)	104,90(6,34)	9,56 (0,18) a
Média	140,89	91,24	106,70	8,96
Coeficiente	16,35	24,56	13,95	14,51
Variação%				

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação aos valores encontrados para o GGT e AST não houve diferença significativa entre o grupo G1 (gestantes) e o grupo G1(não-gestantes).

Na Tabela 2 são apresentadas as médias obtidas quando foram analisados apenas os dados coletados nos dias -7 que antecede ao parto e dia 0 (dia do parto) para o grupo G1(gestantes), sendo estes dados comparados com os dados do grupo G2 (não-gestantes).

Tabela 2. Médias observadas das variáveis FA, GGT, AST (em U/L) e Ca (em mg/dL) para os dados do grupo G1 nos dias -7 e 0 (gestantes) e os dados do grupo G2 (não gestantes).

Grupos	FA	GGT	AST	Ca
Grupo G1	123,12 b	78,50 a	85,06 b	8,22 b
Grupo G2	188,01 a	97,70 a	104,90 a	9,56 a
Média	155,56	88,10	94,98	8,89
Coeficiente	16,43	24,44	10,72	16,76
Variação%				

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade.

Os valores de Ca , FA e AST foram diferentes entre os dois grupos com maiores médias para o grupo G2 (não gestante). Isto pode ter ocorrido em função do metabolismo apresentar-se alterado no periparto, apresentando necessidades diferenciadas dos animais que não estão no periparto.

Quando os dados coletados para o grupo G1 de acordo com os dias de avaliação foram analisados, somente foi observado efeito significativo dos dias sobre a AST como pode ser observado na Figura 1. As médias observadas de FA, GGT, AST e Ca são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. – Médias observadas e erro padrão (entre parênteses) das médias de FA, GGT, AST (U/L) e de Ca (mg/dL) para o grupo G1 (gestantes).

Dias de avaliação	FA	GGT	AST	Ca
-14	142,30 (44,67)	88,30 (41,09)	79,80 (12,99)	9,62 (0,22)
-7	120,83 (42,48)	98,99 (22,22)	85,00 (15,71)	9,66(0,23)
0	125,41 (34,51)	58,00 (19,21)	85,12 (14,05)	6,79(0,53)
+7	111,69 (36,24)	69,41 (23,86)	134,19 (24,32)	8,51(0,26)
+14	109,97 (36,52)	128,60 (47,21)	152,98 (31,67)	9,01(0,27)
Média Geral	122,04	88,66	107,42	8,88
Coeficiente de Variação (%)	16,42	24,43	10,72	16,75
Valores de referências	37 – 196 U/L.	11 – 37 U/L.	39 – 150 U/L.	8,5 – 10, 5 mg/dL

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade.

Na Figura 1 observa-se em relação ao asparatato-aminotransferase (AST) efeito linear crescente ($Y=107,42 + 2,79357X$, $R^2=0,95$), em função dos dias de avaliação.

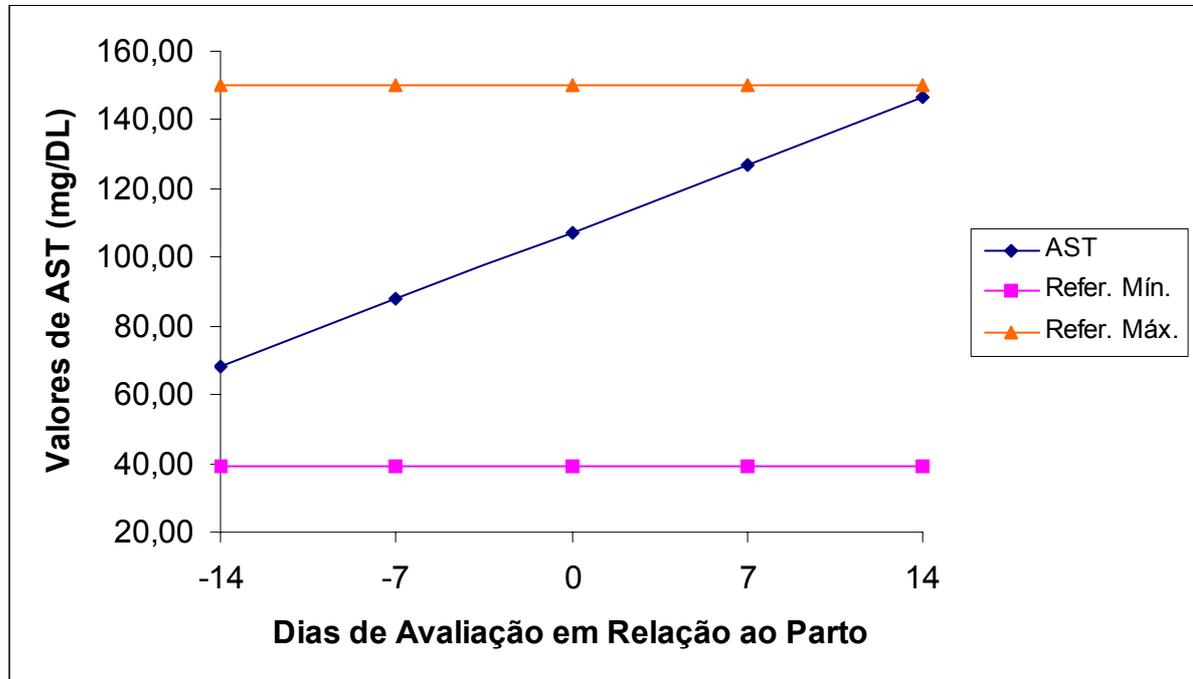


Figura 1. Atividade sérica da AST para os animais do grupo G1 (gestantes).

Pode-se observar na Figura 1 um leve aumento da AST após o parto.

Na Tabela 4 pode se observar os valores de correlação entre os dados obtidos nos dias -7 antes do parto e dia 0 (dia do parto) para o grupo G1 e as duas amostras do grupo G2 (não-gestante).

Tabela 4. – Correlação entre Ca, FA, GGT e AST obtidas para o grupo G1(gestantes) nos dias -7 antes do parto e no dia 0 (dia do parto) e grupo G2 (não gestantes).

		FA	GGT	AST
Ca	G1	0,00 NS	0,07 NS	-0,11 NS
	G2	-0,14 NS	-0,12 NS	0,24 NS
FA	G1	-	-0,29 NS	0,39*
	G2	-	0,18 NS	-0,04 NS
GGT	G1	-	-	0,09 NS
	G2	-	-	-0,02 NS

Para estes dados foi significativa apenas a correlação embora baixa entre FA e AST ($r = +0,39$) para o grupo G1, indicando que o aumento da FA pode estar associado ao aumento da AST nas vacas gestantes no período do periparto.

Para o grupo G2 não foram observadas correlações entre nenhuma das variáveis.

No decorrer do experimento um dos animais pertencente ao grupo G1 (gestantes), o animal (009) apresentou hipocalcemia clínica, com toda sintomatologia característica inclusive decúbito lateral. A vaca com hipocalcemia (009) foi tratada após o nascimento do bezerro, quando já estava em decúbito lateral, com Borogluconato de Cálcio por via intravenosa, apresentando resposta imediata ao medicamento.

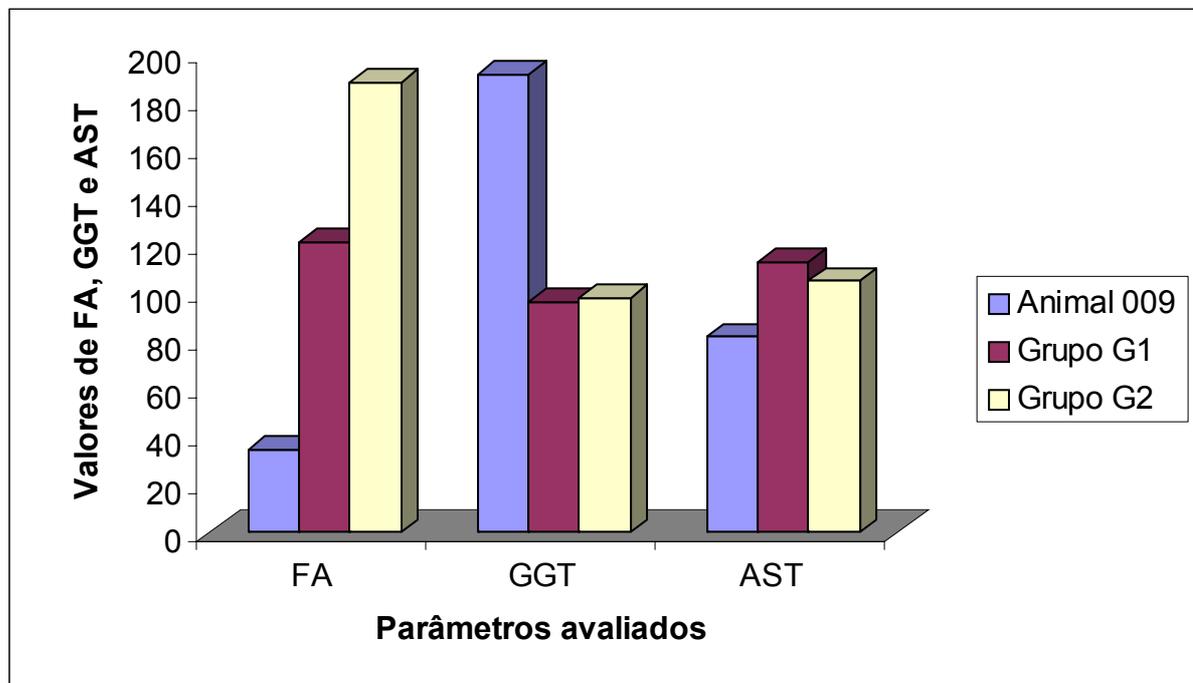


Figura 2. Valores observados de FA, GGT e AST para os animais do grupo gestante (G1), não gestante (G2) e animal que apresentou hipocalcemia.

Pode-se observar que para o animal que apresentou a hipocalcemia clínica (vaca 009) o nível de FA e AST se mostraram discretamente abaixo da média dos grupos G1(gestantes) e G2 (não-gestantes), já em relação ao GGT houve um aumento para o animal 009 quando comparado com as médias dos grupos G1 e G2.

Os valores de FA, GGT e AST foram correlacionados a várias enfermidades dos bovinos segundo (Hagiwara, Mirandola e Benesi, 1986), já os resultados

encontrados neste experimento não demonstraram correlação com a hipocalcemia da vaca leiteira.

CONCLUSÃO

Analisando os resultados podemos concluir que os valores de referência de parâmetros bioquímicos que avaliam a função hepática, por meio da determinação da atividade enzimática da fosfatase alcalina (FA) e da gama-glutamilttransferase (GGT) e da aspartato-aminotransferase (AST) em vacas leiteiras, não apresentaram efeitos significativos na determinação da hipocalcemia da vaca leiteira, quando comparados os valores encontrados para o grupo G1 (gestantes) e o grupo G2 (não gestantes). Já em relação ao cálcio nos momentos do parto e pós parto para o grupo G1 (gestantes) se mostraram abaixo dos valores encontrados para o grupo G2 (não gestantes), demonstrando que a utilização do cálcio pelo organismo da vaca leiteira no período do periparto é alto e muitas vezes o organismo não consegue suprir esta necessidade levando a uma pré-diposição a hipocalcemia da vaca leiteira.

Diante dos dados obtidos observou-se que os resultados não foram o suficiente para associar a hipocalcemia da vaca leiteira a alterações das funções hepáticas, demonstrando a necessidade de novos estudos complementares em relação as funções hepáticas.

REFERÊNCIAS

BARROS FILHO, I. R. Contribuição ao estudo da bioquímica clínica em zebuínos da raça Nelore (*Bos Indicus*, Linnaeus 1758) criados no Estado de São Paulo. 1995. (Dissertação, Mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo.

BATAVANI, R. A.; MORTAZ, E. K.; DAWOODI, M.A. 2003. Study on frequency, etiology and some enzymatic activities of subclinical mastitis in Urmia, Iran. *Small Ruminant Research*, London, n. 50, p 45 - 50, 2003.

BOUDA, J.; QUEIROS-ROCHA, G.; GONZALEZ, F. H. D. Desequilíbrio de Cálcio Fósforo e Magnésio. In: GONZALEZ, F. H. D.; GORGES, J.B.; CECIM, M. (Ed.). *Uso de provas de campo e de laboratório clínico em doenças metabólicas e ruminais dos bovinos*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. p. 47-52.

BOTELHO, G. G.; NASCIMENTO, S. C. A. G.; SILVEIRA, J. M. Gama-glutamyl-transferase em bovinos de abate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17, 1980, Fortaleza. *Resumos...* Fortaleza: SBMV, 1980. p.30.

BOUDA, J.; DVORAK, V.; MINSKSOVA, R.; DVORAK, A. R. The activities of got, gamma-gt, alkaline phosphatase in blood plasma of cows and their calves fed bucks. *Acta veterinaria (Brno)*, Brno, v. 49, p. 193-198, 1980.

CORNELIUS, C. E.; BISHOP, J.; SWITZER, J.; RHODE E. A. Serum and tissue transaminase activities in domestic animals. *Cornell Veterinarian*, Ithaca, v. 49, p.116-26, 1959.

D'ANGELINO, J. L. Leucose enzoótica dos bovinos. *Estudo retrospectivo da performance produtiva e reprodutiva de animais infectados e não infectados*. 1991. Tese (Livre-Docência) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo.

DGKC - EMPFEHLUNGEN DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE CHEMIE. Standardisierung von Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten in biologischen Flüssigkeiten. Experimentelle Begründung der optimierten Standard-Bedingungen. *Zeitung für Klinisch Chemie und Klinisch Biochemie*, Hannover, v.10, p. 182-192, 1972.

GREGORY, L. *Valores padrões de referência de parâmetros bioquímicos séricos utilizados na avaliação das funções hepática e renal de bovinos, da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo: influência de fatores etários, sexuais e da infecção pelo Vírus da Leucose dos Bovinos*. 1995. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo.

HAGIWARA, M. K.; MIRANDOLA, R. M. S.; BENESI, F.J. Avaliação dos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gama glutamil transferase (GGT), e bilirrubinas séricas em bovinos normais ou infectados pelo vírus da leucose bovina (VLB). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 20., 1986, Cuiabá. *Anais...* Cuiabá: SBMV, 1986. p.135.

KANEKO, J. J. *Clinical biochemistry of domestic animal*. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1989.

KIMURA, K.; REINHARDT, T. A.; GOFF, J. P. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.89, p.2588-2595, 2006.

LOPES, H .O. S.; FERREIRA NETO, J. M. Níveis de transaminase glutâmica oxalacética no soro sangüíneo de bovinos criados no cerrado. *Arquivos da Escola de Veterinaria da Universidade Federal de Minas Gerais*, Belo Horizonte, v.8, p.267-71, 1976.

OLISZEWSKI, R.; NUNEZ De KAIRUZ, M. S.; GONSALEZ De ELIAS, S.N.; OLIVER, G. Assessment of β -glucuronidase levels in goat's Milk as na indicator of mastitis: comparison with other mastitis detection methods. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 65, p. 864-866, 2002.

OLIVEIRA, E. B. Níveis das transaminases glutâmico pirúvica e glutâmico oxalacética no soro de bovinos Hosltein-Friesian. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, v.13, p.5-19, 1967.

PERSIJN, J. P.; SLIK, W. A new methode for the determination of gamma-glutamyltransferase in serum. *Journal of Clinical Chemistry & Clinical Biochemistry*, London, v. 14, p. 421-427, 1976.

SCHMID, M.; FOSTNER, L. A. *Laboratorie testing in veterinary medicine diagnosis in the clinical monitoring*. Mannheim: Boehringer, 1986.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, Washington, v. 30, p. 507-512, 1974.

SIMESEN, M. G. NANSEN, P. Serum gama glutamiltranspeptidase (GGT) and aspartate-aminotransferase (AST) activities in adult cattle with chronic *Fasciola hepatica* infeccion. *Acta Veterinária Scandinavica*, Copenhagen, v.15, p. 239-43, 1974.

SIMESEN, M. G.; STORM, P. The diagnostic value of gama-GT estimations on blood samples collected in conjunction with exsanguination of cattle. *Acta Veterinária Scandinavica*, Copenhagen, v.14, p.758-760, 1973.

UNGLAUB, W.; AFSCHAR, A.; MARX, D. Die Aktivität der GGT (gamma-glutayltranspeptidase) im Serum des Rindes. *Deutsche Tierarztliche Wochenschrift*, Hannover, v. 80, p.1 31-34, 1973.

**3.3. PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA LABORATORIAL E MENSURAÇÃO HEMATOLÓGICA DO
OPIÓIDE ENDÓGENO B-ENDORFINA EM BOVINOS LEITEIROS.**

Padronização de Técnica Laboratorial e Mensuração Hematológica do Opióide Endógeno β -endorfina em Bovinos Leiteiros.

Iara de Oliveira Buture³

Resumo: Considerada um distúrbio metabólico da vaca parturiente a Hipocalcemia ocorre em vacas leiteiras de alta produção durante o periparto. Esta enfermidade causa perdas econômicas no agronegócio, por diminuir a produção de leite e causar debilidade na vaca, diminuindo a vida produtiva das mesmas. Alguns ensaios atuais estão sendo conduzidos, no sentido de se verificar a correlação entre o estresse e a intensidade na manifestação da Hipocalcemia da vaca leiteira, sobretudo com o reconhecimento de indicadores biológicos, entre os quais os peptídeos opióides. Ao longo da gestação, ocorre progressivo aumento dos peptídeos opióides endógenos, aumentando assim, suas concentrações no plasma sanguíneo. A fim de minimizar prejuízos na produção leiteira, procuramos estudar e mensurar a concentração da β -endorfina no plasma sanguíneo no período do periparto de vacas leiteiras que sirvam como parâmetros para diagnóstico precoce da Hipocalcemia da vaca leiteira e assim prevenir a instalação da doença.

Palavras-chave: Hipocalcemia, vaca leiteira, vaca parturiente, β -endorfina, tratamento, profilaxia.

Abstract:

Standardization of laboratorial technique and blood measurement of the endogen opioid B-endorphin in dairy bovines: Contributory study.

Considered a metabolic disturb of the parturient cow, Hipocalcemia occurs in dairy cows of high production by the periparto. This ailment causes economic losses in the agro-business, by decreasing milk production milk production and cow debilitation, and diminishing their productive lives. Presently, some essays are being carried on, with the purpose of verifying a correlation between stress and intenseness in the Hipocalcemia manifestation in the dairy cow, especially with the recognition of biologic indicators, such as opium peptides. In the pregnancy, it happens a progressive growth of the endogenous opium peptides, therefore increasing its concentrations in plasma blood. To minimize losses in dairy production we tried to study and measure a B-endorphin concentration in the blood plasma in the periparto period of the dairy cows for parameters for Hipocalcemia precocious diagnostics of the dairy cow and then to prevent the installment of the affection

Keywords: Hipocalcemia, dairy cows, parturient cow, β -endorphin, treatment, prophylaxy.

³ Doutoranda em Ciência Animal Área de Concentração: Sanidade Animal da Universidade Estadual de Londrina.

INTRODUÇÃO

A hipocalcemia da vaca leiteira (HVL) destaca-se entre uma das principais enfermidades observadas nos animais de alta produção. Trata-se de um distúrbio metabólico que costuma acometer vacas leiteiras imediatamente após o parto. Também conhecida como paresia puerperal ou paresia do pós-parto, a HVL é uma doença metabólico-nutricional, que ocorre principalmente no período de 48 horas antes a 72 horas pós-parto (CORBELLINI, 1998).

O efeito da amamentação sobre a condição anovulatória da vaca é um dos grandes problemas dos sistemas de produção que envolve animais de duplo propósito, em todo o mundo (SHORT et al., 1990). Durante mais de meio século, acreditava-se ser o estímulo das mamadas a causa do bloqueio da ovulação durante o período da lactação (MCVEY; WILLIAMS, 1991). Entretanto, Williams, Mcvey Jr e Hunter (1993) concluíram que os estímulos somatossensoriais no teto e no úbere não desempenham papel na supressão da secreção do LH (hormônio luteinizante). Segundo Silveira et al. (1993), a criação de vínculo afetivo da vaca, aliada à interação física do bezerro na região inguinal (cabecadas, amamentação) eram os fatores responsáveis por alterações neuroendócrinas que originam o estado anovulatório. Dentre essas mudanças, destacam-se o aumento da sensibilidade do hipotálamo ao “feed-back” negativo do estrógeno e aumento dos estímulos dos opióides que suprimem a secreção de GNRH (hormônio gonadotrófico) e LH (GRIFFITH; WILLIAMS, 1996).

Dentre os opióides, destacam-se as endorfinas e as encefalinas, sendo a β -endorfina a mais potente de todas. Esses opióides endógenos inibem a liberação de GNRH por atuar diretamente sobre os neurônios produtores de GNRH, além de agirem na hipófise inibindo a liberação de LH (GRIFFITH; WILLIAMS, 1996).

A habilidade das vacas amamentando em desbloquearem a ação dos opióides endógenos durante o início do pós-parto, depende do nível de ingestão de energia e proteína a que estão submetidas. Ainda segundo Sinclair, Broadbent e Hutchinson (1995), vacas amamentando e com dietas contendo altos teores de energia no início do pós-parto são submetidas por menor tempo à ação bloqueadora dos opióides endógenos sobre a secreção de LH e sendo assim, voltam a ciclar mais rapidamente, quando comparadas àquelas que recebem dietas com baixos teores de energia no início do pós-parto. Parece que a secreção de LH é inibida também

por outros fatores que não os opióides endógenos e que as reservas de LH são influenciadas pela condição nutricional do animal.

Doença caracterizada pelo desequilíbrio súbito na regulação do cálcio, cursando com debilidade muscular e paresia, geralmente com o animal alerta, pode ser causada por alimentação com dieta rica em cálcio e potássio (especialmente nas duas semanas anteriores ao parto), com relação cálcio e fósforo ($\text{Ca}^+ : \text{P}^+$) inadequada ou também, por alteração nos mecanismos reguladores de cálcio sérico. Esse desequilíbrio na regulação no Ca^+ ocorre pela diminuição da atividade da glândula paratireóide e consequente diminuição da secreção de hormônio PTH (paratormônio) no periparto, causada por sobrecarga nutricional com Ca^+ antes do parto. No pós-parto, ocorre uma grande perda de Ca^+ sérico para o colostro o qual, juntamente com a diminuição da atividade da paratireóide, resulta em queda brusca em sua concentração plasmática que suplanta a capacidade de adaptação orgânica do animal, desencadeando assim um quadro clínico de hipocalcemia. Outro fator também importante no desencadeamento da hipocalcemia é a diminuição da absorção intestinal de Ca^+ nos primeiros três dias pós-parto (BOUDA; QUEIROS-ROCHA; GONZALEZ, 2000) e a deficiência de magnésio durante o período fora de lactação (CORBELLINI, 1998).

Os animais que desenvolvem HVL, geralmente, apresentam sinais que se iniciam com excitação, tremores musculares em cabeça, tórax, dorso e extremidades, anorexia, ataxia e debilidade geral. Os sinais normalmente evoluem para prostração e decúbito esternal com paresia, perda de sensibilidade progressiva das extremidades pélvicas até a cabeça, depressão e sonolência, extremidades frias, ausência de movimentos ruminais, retenção de urina, constipação e retenção placentária. Caso o animal não seja tratado, observa-se decúbito lateral e coma que é caracterizado por flacidez muscular, batimentos cardíacos débeis e irregulares, frequência respiratória e temperatura corpórea diminuídas, além de timpanismo (BOUDA; QUEIROS-ROCHA; GONZALEZ, 2000).

O diagnóstico normalmente é feito com base na história clínica, como início repentino dos sinais nas primeiras 24 horas até três dias após o parto, além dos dados do exame físico e constatação de concentração sérica de Ca^+ diminuída ($<1,6 \text{ mmol/L}$ ou 4 mg/100ml) (Bouda, Queiros-Rocha e Gonzalez, 2000). No diagnóstico diferencial, devem ser incluídas as enfermidades toxêmicas graves, causadas por mastite flegmonosa ou por peritonite, hipomagnesemia, acidose

ruminal e problemas que resultem em decúbito. Segundo Palhano (2001), o quadro de hipocalcemia da vaca parturiente pode ser confundido com o de cetose, que pode ocorrer alguns meses após a lactação devido a balanço energético negativo.

O tratamento da HVL, assim como o seu diagnóstico, é simples e se baseia na administração de soluções de cálcio endovenoso, sempre com controle da frequência cardíaca através da auscultação (BOUDA; QUEIROS-ROCHA; GONZALEZ, 2000). Deve-se evitar que os animais fiquem em locais inadequados com superfícies lisas e escorregadias, pois este cuidado pode prevenir a miopatia do esforço ou outras lesões musculoesqueléticas frequentes nas vacas hipocalcêmicas que se debatem para levantarem-se em pisos escorregadios. Quanto à ordenha completa pode-se afirmar que não existe consenso entre os profissionais, sendo que a ordenha incompleta favoreceria o tratamento da hipocalcemia, mas por outro lado, a vaca ficaria exposta a mastites, Rebhun (1999) comenta que a ordenha incompleta favorece o aparecimento da mastite.

Segundo Castro (2003), o tratamento da hipocalcemia clínica na vaca leiteira deve começar o mais rápido possível e de preferência no primeiro estágio, ainda de acordo com o autor mencionado, vacas tratadas em estágios adiantados possuem queda na produção de leite, acarretando uma diminuição na lactação total do animal. A hipocalcemia é facilmente tratada com soluções de cálcio intravenoso sendo o borogluconato de cálcio o mais indicado, segundo (MARÇAL, 1996), devido à sua ação muito rápida. O uso de compostos preparados com vitaminas, dextrose e sais minerais (Drench) também pode auxiliar no tratamento.

Goff (2008) indica como tratamento a aplicação de Ca (borogluconato de cálcio) endovenosa e relata que as preparações comerciais contêm também magnésio, fósforo e glicose em suas fórmulas. O cálcio pode ser aplicado também via subcutânea apresentando maior variação na absorção. Segundo Melendez et al. (2002), para melhor controle da hipocalcemia, uma dose é aplicada logo após a vaca parir e outra dose deve ser aplicada de 6 a 12 horas depois da primeira dose.

Segundo o mesmo autor, o uso de cálcio oral é indicado, mas com a observação de que seria mais recomendado como tratamento preventivo, e que a vitamina D pode ser usada no tratamento preventivo da hipocalcemia da vaca leiteira, ressaltando sempre que o tratamento é eficaz na prevenção da doença, Goff (2008).

Segundo Charbonneau, Pellerin e Oetzel (2006), o melhor tratamento para a hipocalcemia é diminuir o risco de incidência da patologia usando a DCAD de forma correta no período do peri-parto das vacas leiteiras. Já Lean et al. (2006), salienta que uma DCAD com baixo percentual de Ca, fornecida por longos períodos no período pré-natal, pode levar a baixa de Ca disponível nos ossos, aumentando o risco da patologia se estabelecer. O autor comenta ainda que o aumento do Mg em dietas pré parto pode diminuir a incidência de hipocalmia.

Em pesquisas realizadas com o naloxone, um antagonista opióide (SCORSCI; DELLÁQUILA; MINOIA, 2001) concluíram que o naloxone foi seguramente efetivo no tratamento da hipocalcemia tanto quanto a terapia de cálcio, conforme estes autores a terapia eletiva é administrar esse tipo de antagonista que farmacologicamente ocupa os receptores de opióides nas células, sem afetar o comportamento, tendo uma meia vida de 15 a 20 minutos. Em outro ensaio ainda, os autores compararam o efeito do cálcio e do naloxone no tratamento da hipocalcemia, não encontrando diferença estatística na resposta. A terapia com borogluconato de cálcio recuperou 67% das vacas em menos de 30 minutos e 33% precisaram de tratamentos repetidos. O uso de naloxone recuperou 100% das vacas tratadas, sendo que 58,8% das vacas recuperaram-se dentro de 20 minutos e em 41,2% das vacas, foi necessário repetir o tratamento.

Estudos realizados, segundo Horst, Goff e McCluskey (2003), demonstram que levantamentos nos USA, sugerem que cerca de 5% das vacas leiteiras desenvolvem a hipocalcemia da vaca leiteira. Em pesquisa realizada no Brasil foi encontrada a incidência de 4,25 % de casos de hipocalcemia da vaca leiteira e, segundo Ortolani (1995), a letalidade pode chegar próxima de 12,8%. Aproximadamente US\$ 20 milhões de dólares são gastos anualmente no tratamento e controle da HVL, sendo que a metade desse valor gasto com medicamentos. Outro prejuízo constatado é na produção leiteira, já que as vacas reduzem em cerca de 60kg sua produção e perdem por volta de 15kg de peso corpóreo, além de terem sua vida produtiva diminuída e serem descartadas precocemente. Deve-se ainda considerar o fato que vacas com HVL tenham seis vezes mais chance de desenvolverem mastite do que as vacas sem o problema, além de terem maior incidência de retenção de placenta, deslocamento de abomaso, e paralisia nervosa (CASTRO, 2003). Ainda segundo o autor, todas estas enfermidades estão inter associadas e basta que a HVL ocorra para a susceptibilidade às outras doenças

ocorrerem também. A incidência média desta enfermidade é de 5% a 6%, mas estima-se que 50% das vacas apresentam hipocalcemia sub-clínica após o parto. Estas vacas hipocalcêmicas estariam susceptíveis às outras doenças pós-parto. Pesquisas mostram que vacas que apresentam HVL são 23,6 vezes mais propensas a desenvolver problemas de cetose e quatro vezes mais propensas a apresentar retenção de placenta.

Estudos estão sendo realizados para verificar a correlação entre o estresse e a intensidade da manifestação da hipocalcemia da vaca leiteira, sobretudo com o reconhecimento de indicadores biológicos, entre os quais os peptídeos opióides. No período da gestação, segundo Marques (2001) ocorre um progressivo aumento dos peptídeos opióides endógenos, aumentando assim, as suas concentrações no plasma sanguíneo.

Segundo Sciorsi, Dell'Aquila e Minoia (2001), estudos demonstraram haver uma tendência em se acreditar que os peptídeos opióides endógenos fossem também responsáveis pelo desencadeamento da hipocalcemia da vaca leiteira.

Tentando contribuir para a prevenção e controle da hipocalcemia da vaca leiteira, diminuindo assim perdas e prejuízos na produção leiteira, procuramos avaliar as variações da concentração sérica de β -endorfina em vacas leiteiras de alta produção.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos animais

Foram utilizadas 20 vacas de leite de alta produção, procedentes de leiteria da região sul do Paraná, da raça Holandesa Preta e Branca, sendo 10 vacas gestantes e lactantes o grupo (G1) e em produção de leite no sistema duas ordenhas/dia e 10 vacas não gestantes e lactantes o grupo (G2) e em produção de leite no sistema duas ordenhas/dia.

Os animais foram mantidos numa área de 12 hectares, divididos em seis piquetes com 2,0 hectares cada, separados por cerca eletrificada composta de dois fios de arame, sendo o primeiro fio distante 0,45m do solo com espaçamento de 0,45m entre os fios. Os piquetes tinham um cocho d'água e um cocho coberto para

suplementação mineral. Os animais ficaram alojados em piquetes formados por capim italiano, azevém e aveia, sendo suplementados com silagem de milho, silagem de aveia, farelo de milho, suplemento concentrado por produção e sal mineral a vontade.

Os animais selecionados para o experimento foram desverminados, com produto de amplo espectro no período que antecedeu o início do experimento. Além do vermífugo, os animais receberam doses de reforço contra aftosa e raiva.

O experimento teve uma duração de onze meses, sem período de adaptação dos animais.

Colheita das amostras

As amostras de sangue dos animais do grupo G1 foram colhidas no -14 e -7 dias anteriores ao parto; no dia 0 do parto, e no +7 e +14 dias após o parto. Com relação aos animais do grupo G2, foram colhidas duas amostras em dois diferentes dias escolhidos aleatoriamente, sendo a primeira colheita no início do experimento e a segunda, no final do experimento.

O sangue foi colhido através de venopunção jugular, utilizando-se agulhas descartáveis e tubos tipo *vacutainer* da marca BD de 10 ml.

O plasma foi obtido após centrifugação das amostras a 3000 rpm, durante 8 minutos e alíquotas de 3ml que foram acondicionadas em tubo tipo ependorfs e congeladas.

Para a dosagem da Beta-endorfina foi utilizado um kit de Radioimunoensaio comercial específico para a Beta-endorfina humana produzido pela empresa Euro - Diagnóstica sueca, representada no Brasil pela empresa Gênese Produtos Diagnóstico e se baseia na reação competitiva entre um anticorpo contra a Beta-endorfina marcada com Iodo-radioativo acrescentado ao meio de reação e aquela presente em amostras de plasma colhidas com EDTA e Trasylol e imediatamente congeladas até o dia do ensaio, quando foram submetidas à extração de possíveis interferentes com colunas de sílica C18 e ressuspendidas com solução de tampão-buffer. Após período de incubação, foi feita a separação com Polietilenoglicol (PEG) e a radioatividade restante em tubo foi aferida com uso de um Contador Gama (Perkin Elmer, INC). A quantidade aferida foi "plotada" (grupo G1), e

comparada com as quantidades conhecidas (padrão – grupo G2) e os valores encontrados foram inversamente proporcionais àqueles encontrados na amostra. Sendo a especificidade dos anticorpos dirigida à Beta-endorfina, a reatividade cruzada com a β -endorfina bovina (que guarda uma homologia estrutural) foi a base teórica da proposição.

O ensaio foi realizado junto à equipe técnica da CRIESP - Central de Radioimunoensaio de São Paulo - empresa do Grupo NKB/Fleury, em sua sede em São Paulo e com a supervisão da equipe de assessoria da Gênese.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância para verificar as diferenças entre os grupos gestantes e não gestantes.

Para o grupo G1 (vacas gestantes), foi realizada análise de regressão dos parâmetros estudados em função dos dias de avaliação em relação ao dia do parto.

Foi também realizada análise de correlação entre parâmetros estudados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores referentes à concentração de Cálcio e de β -endorfina sérica do grupo G1 e do grupo G2 obtidos das amostras estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Concentração sérica média de Cálcio e de β -endorfina em mg/dL, em vacas gestantes na fase de periparto (G1) e em vacas não-gestantes (G2) e erro padrão entre parênteses.

Grupos	Ca (mg/dL)	β-Endorfina (mg/dL)
Gestante-G1	8,72 (0,20) b	335,99 (15,11)
Não-gestante-G2	9,56 (0,18) a	316,10 (10,24)
Média Geral	8,96	329,31
Coeficiente de Variação (%)	16,76	29,79

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si significativamente ($P < 0,05$).

Quando se compararam as médias de Ca e de β -endorfina para os dois grupos estudados, pode se observar, na Tabela 1, que os valores de Ca diferiram entre os grupos e que os valores de β -endorfina, embora não significativo, apresentaram tendência de serem maiores para as vacas grupo G1 (gestantes).

Quando foram feitas as análises considerando apenas os dias -7 e dia 0 para o grupo G1 comparados com o grupo G2, o comportamento foi similar (Tabela 2) com tendência de maior média de β -endorfina para os animais do grupo G1(gestantes).

Tabela 2. Concentração sérica média de Cálcio e de β -endorfina em mg/dL, em vacas gestantes nos dias -7 e dia 0 em relação ao parto (G1) e em vacas não-gestantes (G2).

Grupos	Ca (mg/DL)	β-Endorfina (mg/DL)
Gestante-G1	8,22 b	342,64
Não-gestante-G2	9,56 a	316,10
Média Geral	8,89	329,37
Coeficiente de Variação (%)	16,76	24,85

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si significativamente ($P < 0,05$).

Na Tabela 3 são apresentadas as médias observadas e os erros padrão das médias (entre parênteses), para os valores observados de Cálcio e β -endorfina, nos diferentes dias de avaliações realizadas para o grupo G1 (vacas gestantes).

Tabela 3. – Médias observadas e erro padrão das médias (entre parênteses) de Cálcio e de β -endorfina para os animais do grupo G1(gestantes) de acordo com os dias de avaliação.

Dias de Avaliação	Ca (mg/dL)	β -endorfina (mg/dL)
-14	9,62 (0,22)	310,76 (32,66)
-7	9,66(0,23)	340,04 (25,48)
0	6,79(0,53)	345,24 (41,66)
+7	8,51(0,26)	349,76 (44,10)
+14	9,01(0,27)	334,16 (26,71)
Média Geral	8,72	335,99
Coeficiente de Variação (%)	11,80	32,90

Comparando os valores de Ca e β -endorfina de acordo com os dias de avaliação, observa-se que os valores de Ca diminuíram no dia 0 (dia do parto), ao contrário do que ocorreu com os valores de β -endorfina, que aumentaram no dia do parto, indicando a possibilidade de uma correlação negativa entre estes parâmetros.

Durante o experimento, uma das vacas (animal 009) apresentou sintomatologia clínica de hipocalcemia, com sintomas característicos da enfermidade, inclusive decubito lateral. A vaca com hipocalcemia (009) foi tratada após o nascimento do bezerro, quando já estava em decúbito lateral, com borogluconato de cálcio por via intravenosa, apresentando resposta imediata ao medicamento.

Na Figura 1 é apresentado o comportamento dos níveis de β -endorfina em função dos dias de avaliação para a média do grupo G1 e para o animal que apresentou hipocalcemia clínica (animal 009). Pode-se observar que o nível de β -endorfina deste animal, a partir do dia -7 em relação ao parto, apresentou-se acima da média do grupo G1 (gestantes).

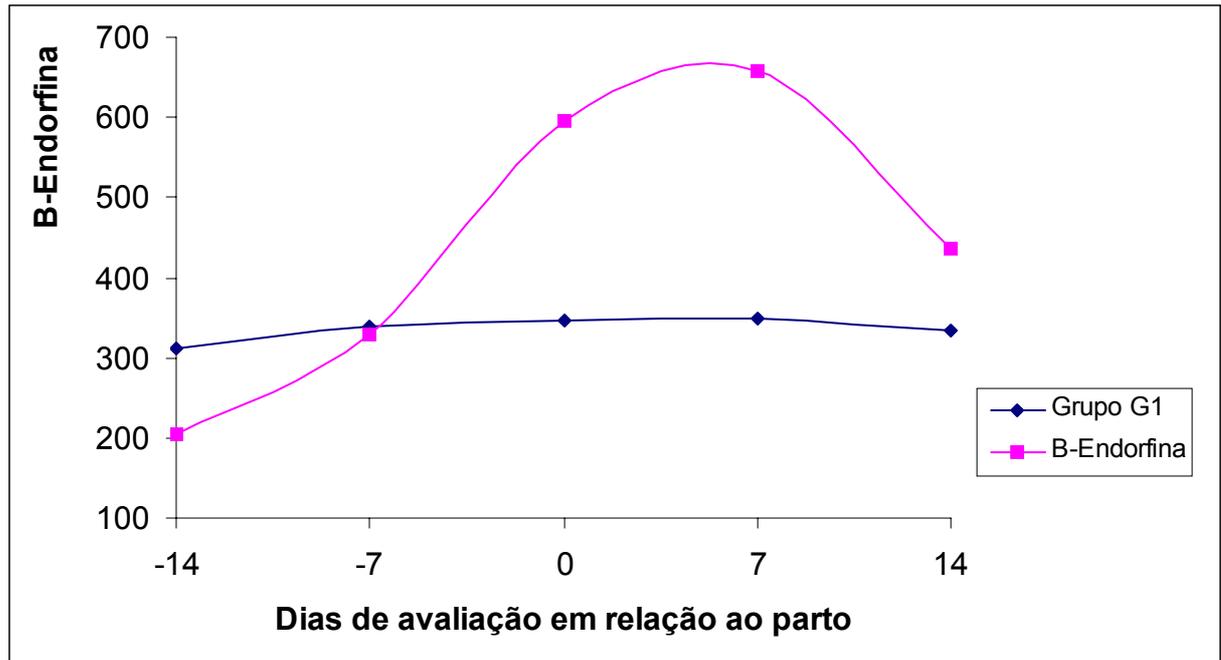


Figura 1. β -endorfina em função dos dias de avaliação para animais do grupo G1 e para o animal que apresentou hipocalcemia.

Pode ser observado um discreto aumento dos valores da β -endorfina para o grupo G1 (gestante). Em relação a vaca com hipocalcemia clínica (animal 009) observou-se um acentuado aumento da β -endorfina nos dias mais próximos do parto.

Podem ser também vistos na Figura 2 os comportamentos do Ca e da β -endorfina, para os grupos G1 (gestantes) e G2 (não-gestantes) e também do único animal que apresentou a hipocalcemia clínica (009) que pertencia ao grupo G1 (gestantes).

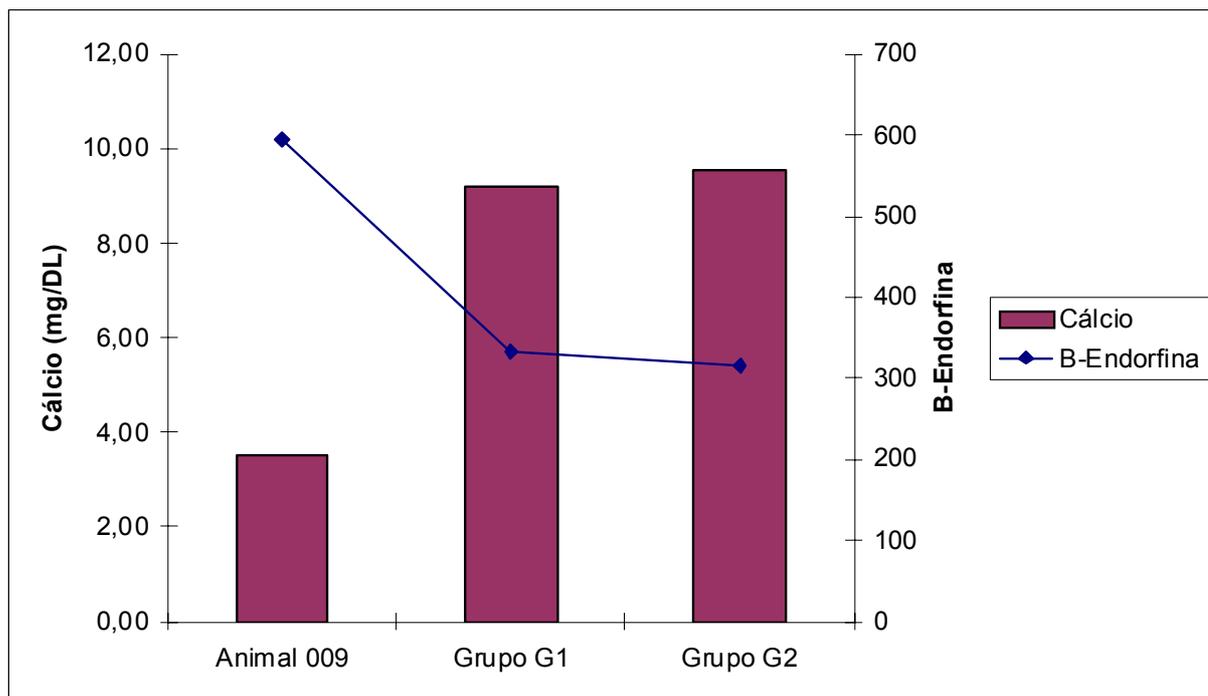


Figura 2. Valores observados de Ca e β -endorfina para os animais do grupo gestante (G1), não gestante (G2) e animal que apresentou hipocalcemia.

Observa-se que o animal que ficou doente (vaca 009) apresentou nível de β -endorfina acima da média dos grupos G1 (gestante) e G2 (não-gestante) e valor de Ca abaixo da média destes grupos, indicando uma possível associação entre estes parâmetros, porém o valor de correlação observado ($r = -0,21$) não foi significativo, mas é um indicativo de que o aumento da β -endorfina aparenta estar relacionado à redução do nível de Ca.

Os resultados encontrados neste experimento demonstram que a β -endorfina sanguínea aumentou no período do parto como demonstrou o grupo G1 (gestantes) quando comparados com os valores encontrados para o grupo G2 (não gestantes), concordando com os autores (Sciorsi, Dell' Áquila e Minoia 2001) que os peptídeos opióides endógenos podem estar associados ao processo de desencadeamento da hipocalcemia da vaca leiteira. No animal 009 que apresentou a forma clínica da hipocalcemia da vaca leiteira o aumento da β -endorfina foi bem acentuado quando comparado com o grupo G2 (não gestantes), concordando com a correlação feita por (Marques 2001) entre estresse e a intensidade da hipocalcemia da vaca leiteira com o reconhecimento de indicadores biológicos entre os quais os

peptídeos opióides. O cálcio apresentou-se bem abaixo dos valores de referências, nos valores mensurados para o animal 009 (3,52 mg/dL), sendo esses valores de cálcio considerados por (Rebhun, 1999) como valores encontrados em bovinos comatosos.

Analisando as variações nas concentrações da β -endorfina, somada às variações do parto e individual, constatou-se que o aumento da β -endorfina pode estar correlacionado com o estresse do parto e da alta produção leiteira. Considerando tais possíveis causas, pode-se concluir que podem ser decorrentes de desequilíbrios associados a altos níveis de estresse devido às exigências da alta produção leiteira e pelo parto.

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou a importância de se conhecer as concentrações séricas da β -endorfina e sua curva de variação durante o período do periparto em vacas leiteiras e suas possíveis ligações com a hipocalcemia da vaca leiteira.

A constatação precoce de alterações permitiria a correção dos fatores predisponentes e desencadeantes para o desenvolvimento da doença, evitando assim as perdas econômicas relacionadas à hipocalcemia da vaca leiteira.

REFERÊNCIAS

BOUDA, J.; QUEIROS-ROCHA, G.; GONZALEZ, F. H. D. Desequilíbrio de Cálcio Fósforo e Magnésio. In: GONZALEZ, F. H. D.; GORGES, J.B.; CECIM, M. (Ed.). *Uso de provas de campo e de laboratório clínico em doenças metabólicas e ruminais dos bovinos*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. p. 47-52.

CAMPOS NETO, O.; MARÇAL W. S. Os fosfatos na nutrição mineral de ruminantes. *Revista dos Criadores*, São Paulo, n.793, p.8- 10, 1996.

CASTRO, A. L. Febre do leite: uma doença que deve ser tratada nos estágios iniciais. *Veterinary News*, New York, n. 64, p. 11, 2003.

CHARBONNEAU, E.; PELLERIN, D.; OETZEL, G.R. Impact of lowering dietary cation-anion difference in nonlactating dairy cows: a meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, Champaign, n.89, p.537 – 548, 2006.

CORBELLINI, C. N. Etiopatogenia e controle da hipocalcemia e hipomagnesemia em vacas leiteiras, Porto Alegre, 1998. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE DEFICIÊNCIA MINERAIS EM RUMINANTES. *Anais...* Porto Alegre: UFRGS, 1998.

GOFF, J. P. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *The veterinary Journal*, London, v.176, p.50-57, 2008.

GRIFFITH, M. K.; WILLIAMS, G. L. Roles of maternal vision and olfaction in suckling-mediated inhibition of luteinizing hormone secretion, expression of maternal selectivity, and lactational performance of beef cows. *Biology of Reproduction*, New York, v. 54, p. 761-768, 1996.

HORST, R .L. GOFF, J. P. MCCLUSKEY, B. J. Prevalence of subclinical hypocalcemia in US dairy operations. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 86, (suppl. 1), p. 247, 2003.

LEAN, I. J.; DEGARIS, P. J.; MCNEIL, D. M.; BLOCK, E. Hypocalcemia in dairy cows: meta analysis and dietary cation anion difference theory revisited. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.89, p.669-684, 2006.

MARQUES, L. C. *Doenças metabólicas na vaca leiteira*. 2001. Monografia (Especialização em Medicina dos Animais de Produção) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MCVEY, W. R.; WILLIAMS, G. L. Mechanical masking of neurosensory pathways at the calf-teat interface: endocrine, reproductive and lactational features of the suckled anestrous cow. *Theriogenology*, Stoneham, v. 35, p .931-941, 1991.

MELLENDEZ, H.; DONOVAN, A.; RISCO, C. A.; HALL, M .B.; LITTELL, R.; GOFF, J. Metabolic responses of transition Holstein cows fed anionic salts and supplemented at calving with calcium and energy. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 85, p.1085- 1092, 2002.

ORTOLANI, E. L. Aspectos clínicos, epidemiológicos e terapêuticos da hipocalcemia de vacas leiteiras. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 47, n. 6, p. 799-808, 1995.

PALHANO, H. B. Hipocalcemia: um problema que afeta vacas e cabras leiteiras, ovelhas e cadelas. *Veterinary News*, New York, n. 52, p. 4-5, 2001.

REBHUN, W. C. *Enfermedades del ganado vacuno lechero*. Zaragoza: Acribia, 1999.

SCIORSCI, R. L.; DELL'AQUILA, M .E.; MINOIA, P. Effects of naloxone on calcium turnover in cows affected by milk fever. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.84, p. 1627-1631, 2001.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, Washington, v. 30, p. 507-512, 1974.

SHORT, R. E.; BELLOWS, R. A.; STAIGMILLER, R. B.; BERARDINELLI, J. G. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 68, p. 799-816, 1990.

SILVEIRA, P. A.; SPOON, R. A.; RYAN, D .P.; WILLIAMS, G. L. Evidence for maternal behavior as a requisite link in suckling-mediated anovulation in cows. *Biology of Reproduction*, New York, v. 49, p. 1338-1346, 1993.

SINCLAIR, K. D.; BROADBENT, P.J .; HUTCHINSON, J. S. M. Naloxone evokes a nutritionally dependent LH response in post partum beef cows but not in mid-luteal phase maiden heifers. *Animal Science*, Penicuik, v. 61, p. 219-230, 1995.

WILLIAMS, G. L.; MCVEY JR, W. R.; HUNTER, J. F. Mammary somatosensory pathways are not required for suckling-mediated inhibition of luteinizing hormone secretion and delay of ovulation in cows. *Biology of Reproduction*, New York, v. 49, p. 1328-1337, 1993.

4. CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

- Em relação aos valores encontrados para cálcio quando comparadas as amostras do grupo G1, os resultados demonstraram que os valores de cálcio foram visivelmente menores no dia do parto (0) e no dia (+7) pós-parto quando comparados aos dias (-14 e -7) pré-parto e ao dia (+14) pós-parto. Os valores encontrados no dia do parto e no dia (+7) pós-parto também foram visivelmente menores em relação a ambas as amostras do grupo G2, mostrando que o período de maior incidência está entre os dias 0 (dia do parto) e 7 dias após o parto.
- O estudo das amostras demonstrou alterações mais acentuadas nos valores de cálcio no animal (009) que apresentou quadro clínico de hipocalcemia da vaca leiteira.
- Os valores encontrados para fósforo nas amostras de soro sanguíneo dos bovinos leiteiros do grupo G1 nos dias do parto (0) e no dia +7 pós-parto apresentaram valores abaixo dos encontrados nos dias (-14 e -7) pré-parto, dia (+14) pós parto e em relação a ambas as amostras do grupo G2, mostrando que o fósforo tem participação na patogenia da HVL.
- Nos resultados das análises para o magnésio das amostras do soro sanguíneo das vacas leiteiras não foram encontradas alterações dignas de nota entre as amostra do grupo G1 (-14, -7, 0, +7, +14), também não foram encontradas alterações quando comparadas as amostras do grupo G1 em relação às amostras grupo G2.
- Em relação aos valores encontrados para a fosfatase alcalina nas amostras não foram encontradas variações entre os períodos do pré-parto (-14 e -7), parto (0) e pós-parto (+7 e +14) entre si, nem quando comparadas as amostras do grupo G1 em relação a ambas amostra do grupo G2.
- O estudo demonstrou que o gama-glutamilttransferase apresentou valores visivelmente diminuídos no dia do parto e aos +7 dias após o parto quando comparados aos dias (-14 e -7) pré-parto e ao dia (+14) pós-parto do grupo G1, os resultados dos dias do parto e do dia +7 pós-parto também foram menores que ambos os resultados de ambas amostras do grupo G2.

- Os valores encontrados como resultados para o aspartato-aminotransferase nas amostras do grupo G1 apresentaram-se diminuídos nos dias que antecedem o parto (-14 e -7) e no dia do parto (0) quando comparados aos dias que sucedem ao parto (+7 e +14) e em relação a ambas as amostras do grupo G2.
- O período do periparto em vacas leiteiras não influi no metabolismo hepático.
- A mensuração da β -endorfina em bovinos leiteiros de alta produção apresentou resultados positivos em relação ao estresse do período do periparto.
- Em rebanhos bovinos leiteiros da região sul do Estado do Paraná, onde as vacas leiteiras apresentam alta produção, os valores da β -endorfina se apresentou aumentado no animal 009 que apresentou quadro clínico de hipocalcemia da vaca leiteira.

REFERÊNCIAS

- BARROS FILHO, I. R. Contribuição ao estudo da bioquímica clínica em zebuínos da raça Nelore (*Bos Indicus*, Linnaeus 1758) criados no Estado de São Paulo. 1995. (Dissertação, Mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo.
- BATAVANI, R. A.; MORTAZ, E. K.; DAWOODI, M.A. 2003. Study on frequency, etiology and some enzymatic activities of subclinical mastitis in Urmia, Iran. *Small Ruminant Research*, London, n. 50, p 45 - 50, 2003.
- BEEDE, D. K. The DCAD concept: transition rations for dry pregnant cows. *Feedstuffs*, London, v. 64, p. 12-19, 1992.
- BEEDE, D. K.; PILBEAN, T. E.; PPUFFENBARGER, S. M.; TEMPELMAN, R.J. Peripartum responses of Holstein cows and heifers fed graded concentrations of calcium (calcium carbonate) and anion (chloride) three weeks before calving. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 84, p. 83, 2001.
- BOTELHO, G. G.; NASCIMENTO, S. C. A. G.; SILVEIRA, J. M. Gama-glutamyl-transferase em bovinos de abate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17, 1980, Fortaleza. *Resumos...* Fortaleza: SBMV, 1980. p.30.
- BOUDA, J.; DVORAK, V.; MINSKSOVA, R.; DVORAK, A. R. The activities of got, gamma-gt, alkaline phosphatase in blood plasma of cows and their calves fed buckts. *Acta veterinaria (Brno)*, Brno, v. 49, p. 193-198, 1980.
- BOUDA, J.; QUEIROS-ROCHA, G.; GONZALEZ. F. H. D. Desequilíbrio de Cálcio Fósforo e Magnésio. In: GONZALEZ, F. H. D.; GORGES, J.B.; CECIM, M. (Ed.). *Uso de provas de campo e de laboratório clínico em doenças metabólicas e ruminais dos bovinos*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. p. 47-52.
- CAMPOS NETO, O.; MARÇAL W. S. Os fosfatos na nutrição mineral de ruminantes. *Revista dos Criadores*, São Paulo, n.793, p.8- 10, 1996.
- CAMPOS, J. M. S. *Balanço dietético cátion-ânion na alimentação de vacas leiteiras, no período do pré-parto*. 1998. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CASTRO, A. L. Febre do leite: uma doença que deve ser tratada nos estágios iniciais. *Veterinary News*, New York, n. 64, p. 11, 2003.
- CÉSAR, D. *Hipocalcemia puerperal*. Montevideo, 2003. Disponible em: <http://www.planagro.com.uy/publicaciones> Revista R 96Hipocalcemia_puerperal. Acesso em: jun. 2008.

CESCO, F. T. R. S. *Indução experimental de hipocalcemia em vacas: avaliações clínicas, bioquímicas e terapêuticas*. 2001. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal.

CHARBONNEAU, E.; PELLERIN, D.; OETZEL, G.R. Impact of lowering dietary cation-anion difference in nonlactating dairy cows: a meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, Champaign, n.89, p.537 – 548, 2006.

CONSTABLE, P. D. Clinical assessment of acid-base status. Strong ion difference theory. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, Philadelphia, v.15, n.3, p. 447-471, 1999.

CONTRERAS, P. A.; MANSTON, R.; SANSOM, B. F. Calcium mobilization in hypomagnesemic cattle. *Research in Veterinary Science*, London, v.33, p.10-16, 1982.

CORBELLINI, C. N. Etiopatogenia e controle da hipocalcemia e hipomagnesemia em vacas leiteiras, Porto Alegre, 1998. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE DEFICIÊNCIA MINERAIS EM RUMINANTES. *Anais...* Porto Alegre: UFRGS, 1998.

CORBETT, R. B. Influence of days fed a close-up dry cow ration and heat stress on subsequent milk production in western dairy herds. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 85 (suppl.1), p. 191, 2002.

CORNELIUS, C. E.; BISHOP, J.; SWITZER, J.; RHODE E. A. Serum and tissue transaminase activities in domestic animals. *Cornell Veterinarian*, Ithaca, v. 49, p.116-26, 1959.

D'ANGELINO, J. L. Leucose enzoótica dos bovinos. *Estudo retrospectivo da performance produtiva e reprodutiva de animais infectados e não infectados*. 1991. Tese (Livre-Docência) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo.

DEGARIS, D. J.; LEAN, J. J. Milk fever in dairy cows: a review of pathophysiology and control principles. *The Veterinary Research*, New York, n.8, p.168, 2008

DEGROOT, M. A. *The effect of prepartum anionic supplementation on periparturient feed intake an behaviour, health and milk production*. 2004. Thesis (Doctor of Philosophy in Animal Sciences) - Oregon State University, USA, Oregon.

DGKC - EMPFEHLUNGEN DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE CHEMIE. Standardisierung von Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten in biologischen Flüssigkeiten. Experimentelle Begründung der optimierten Standard-Bedingungen. *Zeitung für Klinisch Chemie und Klinisch Biochemie*, Hannover, v.10, p. 182-192, 1972.

DHIMAN, T. R.; SASIDHARAN, V. Effectiveness of calcium chloride in increasing blood calcium concentrations of periparturient dairy cows. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 77, p. 1597-1605, 1999.

ELLENBERGER, H. B.; NEWLANDER, J. A.; JONES, C. H. Calcium and requirements of dairy cows. Weekly balances through lactation and gestation periods. *Vermont Agricultural Experiment Station*, Burlington, v.342, p.126-128, Jun. 1932.

GAST, D. R.; MARQUARDT, J. P.; JORGENSEN, N. A.; DELUCA, H. F. Potential use of 1,25-dihydroxycholecalciferol for prevention of parturient paresis. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 62, p. 1009-1013, 1979.

GAYNOR, P. J.; MUELLER, F.J.; MILLER, J. K.; RAMSEY, N.; GOFF, J. P.; HORST, R.L. Parturient hypocalcemia in jersey cows fed alfalfa haylage-based diets with different cation to anion ratios. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 72, p. 2525-2531, 1989.

GOFF, J. P. Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, Philadelphia, v. 16, p. 319-337, 2000.

_____. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *The veterinary Journal*, London, v.176, p.50-57, 2008.

GOFF, J. P.; HORST, R. L. Effects of the addition of potassium or sodium, but not calcium, to prepartum ratios on milk fever in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.80, p.176-186, 1997.

GOFF, J. P.; HOST, R. L.; MULLER, F. J.; MILLER, J. K.; KIESS, G. A.; DOWLEN, H. H. Addition of chloride to a prepartal diet high in cations increases 1,25-dihydroxyvitamin D response to hypocalcemia preventing milk fever. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.74, p. 3863-3871, 1991.

GOFF, J. P.; LITLEDIKE, E. T.; HORST, R. L. Effect of synthetic bovine parathyroid hormone in dairy cows: Prevention of hypocalcemic parturient paresis. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.69, p. 2278-2288, 1986.

GREGORY, L. *Valores padrões de referência de parâmetros bioquímicos séricos utilizados na avaliação das funções hepática e renal de bovinos, da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo: influência de fatores etários, sexuais e da infecção pelo Vírus da Leucose dos Bovinos*. 1995. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo.

GRIFFITH, M. K.; WILLIAMS, G. L. Roles of maternal vision and olfaction in suckling-mediated inhibition of luteinizing hormone secretion, expression of maternal

selectivity, and lactational performance of beef cows. *Biology of Reproduction*, New York, v. 54, p. 761-768, 1996.

HAGIWARA, M. K.; MIRANDOLA, R. M. S.; BENESI, F.J. Avaliação dos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gama glutamil transferase (GGT), e bilirrubinas séricas em bovinos normais ou infectados pelo vírus da leucose bovina (VLB). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 20., 1986, Cuiabá. *Anais...* Cuiabá: SBMV, 1986. p.135.

HEUER, C.; SCHUKKEN, Y. H.; DOBBELAAR, P. Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.82, p.295-304, 1999.

HIBBS, J. W.; CONRAD, H .R. Milk fever in dairy cows. VII. Effect of continuous vitamin D feeding on incidence of milk fever. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.59, p. 944-1946, 1976.

HORST, R .L.; GOFF, J. P.; MCCLUSKEY, B. J. Prevalence of subclinical hypocalcemia in US dairy operations. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 86, (suppl. 1), p. 247, 2003.

HORST, R. L. Regulation of calcium and phosphorus homeostasis in the dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 69, p.04-616, 1986.

HORST, R. L.; EISMAN, J. A.; JORGENSEN, N. A.; DELUCA, H. F. Adequate response of plasma 1,25-dihydroxyvitamin D to parturition in paretic (milk fever) dairy cows. *Science*, London, v. 196, p .662-663, 1977.

KANEKO, J. J. Clinical biochemistry of domestic animal. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1989.

KARATZIAS, H. Untersuchungen über die Wirksamkeit von Cholekalziferol und Flumethason zur Prophylaxe der hypokalzämischen Gebärparese bei Milchkuhen. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, Hannover, v. 99, p.326-327, 1992.

KATSOULOS, P. D.; ROUBIES, N.; PANOUSIS, N.; ARSENOS, G.; CHRISTAKI, E.; KARATZIAS, H. Effects of long-term dietary supplementation with clinoptilolite on incidence of parturient paresis and serum concentrations of total calcium, phosphate, magnesium, potassium and sodium in dairy cows. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v.66, p.2081-2085. 2005.

KIMURA, K.; REINHARDT, T. A.; GOFF, J. P. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.89, p.2588-2595, 2006.

LEAN, I. J.; DEGARIS, P. J.; MCNEIL, D. M.; BLOCK, E. Hypocalcemia in dairy cows: meta analysis and dietary cation anion difference theory revisited. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.89, p.669-684, 2006.

LECLERC, H.; BLOCK, E. Effects of reducing dietary cation-anion balance for prepartum dairy cows with specific reference to hypocalcemic parturient paresis. *Canadian Journal of Animal Science*, Ottawa, v. 69, p.411-417, 1989.

LITTLEDIKE, E. T.; HORST, R. L. Vitamin D3 toxicity in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.65, p.749-759, 1982.

LOPES, H .O. S.; FERREIRA NETO, J. M. Níveis de transaminase glutâmica oxalacética no soro sangüíneo de bovinos criados no cerrado. *Arquivos da Escola de Veterinaria da Universidade Federal de Minas Gerais*, Belo Horizonte, v.8, p.267-71, 1976.

MARQUES, L. C. *Doenças metabólicas na vaca leiteira*. 2001. Monografia (Especialização em Medicina dos Animais de Produção) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MCVEY, W. R.; WILLIAMS, G. L. Mechanical masking of neurosensory pathways at the calf-teat interface: endocrine, reproductive and lactational features of the suckled anestrous cow. *Theriogenology*, Stoneham, v. 35, p .931-941, 1991.

MELLENDEZ, H.; DONOVAN, A.; RISCO, C. A.; HALL, M .B.; LITTELL, R.; GOFF, J. Metabolic responses of transition Holstein cows fed anionic salts and supplemented at calving with calcium and energy. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 85, p.1085- 1092, 2002.

MULLEN, P. A. Clinical and biochemical responses to the treatment of milk fever. *Veterinary Record*, London, v.97, p.87-92, 1975.

_____. Milk fever: a case against polypharmacy solutions. *Veterinary Record*, London, v. 101, p. 405-407, 1977.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, *Nutrient Requirements of dairy Cattle*. Washington, DC: National Academy Press, 2000.

OETZEL, G. R. Management of dry cows for the prevention of milk fever and other mineral disorders. *The Veterinary clinics of North America: Equine Practice*, Philadelphia, v.16, p.369-386, 2000.

OLISZEWSKI, R.; NUNEZ De KAIRUZ, M. S.; GONSALEZ De ELIAS, S.N.; OLIVER, G. Assessment of β -glucuronidase levels in goat's Milk as na indicator of mastitis: comparison with other mastitis detection methods. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 65, p. 864-866, 2002.

OLIVEIRA, E. B. Níveis das transaminases glutâmico pirúvica e glutâmico oxalacética no soro de bovinos Hosltein-Friesian. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, v.13, p.5-19, 1967.

ORTOLANI, E. L. Aspectos clínicos, epidemiológicos e terapêuticos da hipocalcemia de vacas leiteiras. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 47, n. 6, p. 799-808, 1995.

PALHANO, H. B. Hipocalcemia: um problema que afeta vacas e cabras leiteiras, ovelhas e cadelas. *Veterinary News*, New York, n. 52, p. 4-5, 2001.

PALLESEN, A.; PALLLESEN, F.; JORGENSEN, R. J.; THILSING, T. Effect of precalving zeolite, magnesium and phosphorus supplementation on periparturient serum mineral concentrations. *The Veterinary Journal*, London, v. 175, n. 2, p. 234-239, Feb. 2008.

PEHRSON, B.; SVENSSON, C.; GRUVAEUS, I.; VIRKKI, M. The influence of acidic diets on the acid-base balance of dry cows and the effect of fertilization on the mineral content of grass. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 82, p. 1310-1316, 1999.

PEHRSON, B.; SVENSSON, C.; JONSSON, M. A comparative study of the effectiveness of calcium propionate and calcium chloride for the prevention of parturient paresis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 81, p. 2011-2016, 1998.

PERSIJN, J. P.; SLIK, W. A new methode for the determination of gamma-glutamyltransferase in serum. *Journal of Clinical Chemistry & Clinical Biochemistry*, London, v. 14, p. 421-427, 1976.

PHILLIPPO, M.; REID, G. W.; NEVISON, I. M. Parturient hypocalcemia in dairy cows: effects of dietary acidity on plasma minerals and calciotropic hormones. *Research in Veterinary Science*, London, v. 56, p. 303-309, 1994.

RAJALA-SCHULTZ, P. J.; GROHN, Y. T. Culling of dairy cows. Part III. Effects of diseases, pregnancy status and milk yield on culling in Finnish Ayrshire cows. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, v. 41, p. 195-208, 1999.

REBHUN, W. C. *Enfermedades del ganado vacuno lechero*. Zaragoza: Acribia, 1999.

ROSSATO, W. L. *Condição metabólica no pós-parto em vacas leiteiras de um rebanho do Rio Grande do Sul*. 2000. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RUDE, R. K. Magnesium deficiency: a cause of heterogeneous disease in humans. *Journal of Bone and Mineral Research*, Washington, v.13, p. 749-758, 1998.

SANSOM, B. F.; ALLEN, W. M.; DAVIES, D. C.; HOARE, M. N.; STENTON, J. R.; VAGG, M. J. Use of lalpha-OH cholecalciferol in preventing post parturient hypocalcaemia and its potential value for the prevention of milk fever in dairy cows. *The Veterinary Record*, London, v. 99, p.310-312, 1976.

SCHMID, M.; FOSTNER, L. A. *Laboratorie testing in veterinary medicine diagnosis in the clinical monitoring*. Mannheim: Boehringer, 1986.

SCIORSI, R. L.; DELL'AQUILA, M. E.; MINOIA, P. Effects of naloxone on calcium turnover in cows affected by milk fever. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.84, p. 1627-1631, 2001.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, Washington, v. 30, p. 507-512, 1974.

SETTI, M. C. ; VIEIRA, P. F. ; ZANETTI, M. A. ; MARTINS, A. S. ; GARCIA, J. A. S. ; MELO, G. M. P. Balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD) para vacas da raça Holandesa, nas concentrações do macrominerais no sangue. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2001, Piracicaba. *Anais...* Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001. v.38, p.1311-1312.

SETTI, M. C.; SCHALCH, E.; ZANETTI, M. A. Estudo do balanço cation-aniônico da dieta no desempenho de vacas holandesas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 27, n. 6, p. 1241-1247, 1998.

SHORT, R. E.; BELLOWS, R. A.; STAIGMILLER, R. B.; BERARDINELLI, J. G. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 68, p. 799-816, 1990.

SILVEIRA, P. A.; SPOON, R. A.; RYAN, D. P.; WILLIAMS, G. L. Evidence for maternal behavior as a requisite link in suckling-mediated anovulation in cows. *Biology of Reproduction*, New York, v. 49, p. 1338-1346, 1993.

SIMESSEN, M. G.; NANSEN, P. Serum gama glutamiltranspeptidase (GGT) and aspartate-aminotransferase (AST) activities in adult cattle with chronic *Fasciola hepatica* infection. *Acta Veterinária Scandinavica*, Copenhagen, v.15, p. 239-43, 1974.

SIMESSEN, M. G.; STORM, P. The diagnostic value of gama-GT estimations on blood samples collected in conjunction with exsanguination of cattle. *Acta Veterinária Scandinavica*, Copenhagen, v.14, p.758-760, 1973.

SINCLAIR, K. D.; BROADBENT, P.J.; HUTCHINSON, J. S. M. Naloxone evokes a nutritionally dependent LH response in post partum beef cows but not in mid-luteal phase maiden heifers. *Animal Science*, Penicuik, v. 61, p. 219-230, 1995.

STEVENSON, M. A.; LEAN, I. J. Descriptive epidemiological study on culling and deaths in eight dairy herds. *Australian Veterinary Journal*, Brunswick, n.76, p.482-488, 1998.

THILSING-HANSEN, T.; JORGENSEN, R. J.; ENEMARK, J. M.; LARSEN, T.. The effect of zeolite a supplementation in the dry period on periparturient calcium, phosphorus and magnesium homeostasis. *Journal of dairy Science*, Champaign, v.85, p.1855-1862, 2002.

UNGLAUB, W.; AFSCHAR, A.; MARX, D. Die Aktivität der GGT (gamma-glutyltranspeptidase) im Serum des Rindes. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, Hannover, v. 80, p.1 31-34, 1973.

VAN DE BRAAK, A. E.; VAN'T KLOSSTER, A. T.; MALESTEIN, A. Influence of a deficient supply of magnesium during the dry period on the rate of calcium mobilization by dairy cows at parturition. *Research in Veterinary Science*, London, v. 42, p. 101-108, 1987.

WANG, C.; VÉLEZ, J. S.; RISCO, C. A. Avanços recentes na prevenção da paresia do parto nas vacas leiteiras. *Compêndio de educação continuada*, São Paulo, v. 1, n.1, p. 63-67, 1996.

WESTERHUIS, J. H. De preventie van melkziekte door voedingsmaatre gelen by kalvende koien met een melkziekte geschiedenis. *Tijdschr-Diergeneeskd*, Hannover, v. 100, p. 213-220, 1975.

WILLIAMS, G. L.; MCVEY JR, W. R.; HUNTER, J. F. Mammary somatosensory pathways are not required for suckling-mediated inhibition of luteinizing hormone secretion and delay of ovulation in cows. *Biology of Reproduction*, New York, v. 49, p. 1328-1337, 1993.

WILSON, G. F. Development of a novel concept (calcigard) for activation of calcium absorption capacity and prevention of milk fever. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Kobenhavn, v. 97, p.7 7-82, 2003.

ZEPPERITZ, H.; JAHREIS, G.; KIUPEL, H.; HESSE, V. The effects of intramuscularly administered vitamina D₃, 25- and 1 α -hydroxycholecalciferol on mineral deposits in soft tissues. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin*, Berlin, v.38, p.763-769, 1991.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Aspartato-aminotransferase

AST-PP - CAT. 421

Tampão: 1 x 160 mL

Coenzima: 1 x 40 mL

Método: Cinético-UV

Finalidade: Dosagem da Transaminase Oxaloacética (TGO ou AST).

Amostra: Soro.

Bireagente - Necessita preparar Reagente de Trabalho

Estabilidade do Reagente de Trabalho: 60 dias

Necessita equipamento com cubeta termostatizada.

Tempo de Reação: 5 minutos a 37° C.

Linearidade: 500 U/L.

PREPARO DO REAGENTE DE TRABALHO

De acordo com o número de testes, misturar suavemente, 4 volumes de Tampão (1) com 1 volume de Coenzima (2). **Exemplo:** 4 mL de Tampão (1) mais 1 mL de Coenzima (2). Homogeneizar. Estável por 2 meses entre 2-8°C.

Cuidados e Precauções Especiais:

- 1- O kit destina-se somente para uso diagnóstico *in vitro*.
- 2- Aplicar os cuidados habituais de segurança na manipulação dos reagentes e amostra biológica. Fazer referência ao manual ou POP de segurança.
- 3- Os reagentes utilizados em condições técnicas adequadas e armazenados nas condições especificadas são estáveis até a validade citada na embalagem.
- 4- O reagente uma vez usado contém soro, plasma ou urina, eventualmente infectado, e deve ser tratado como material potencialmente infeccioso. Fazer o descarte em lugar apropriado.
- 5- Os reagentes não contêm substâncias perigosas nas quantidades reportadas. Em caso de vazamento acidental, lavar o local com água corrente.
- 6- Recomenda-se o uso de luvas descartáveis durante o manuseio das substâncias. Em caso de contato com os olhos ou pele, lavar abundantemente com água corrente. Em caso de ingestão, procurar atendimento médico.

EQUIPAMENTOS

Procedimento técnico manual

- Banho-Maria a 37°C
- Espectrofotômetro ou fotômetro para leituras em UV (340 nm), com cubeta termostatizada.

- Pipetas automáticas
- Cronômetro

Procedimento Técnico Automatizado

Citar nome, modelo e o local onde se encontra o equipamento; Fazer referência ao manual ou POP para utilização do mesmo.

Procedimento Técnico Alternativo

Citar o equipamento alternativo e os procedimentos para medição dos ensaios. Indicar as possíveis diferenças quando os procedimentos manuais substituírem os procedimentos automatizados.

PROCEDIMENTO

Procedimento Manual:

1- Termostatar o Reagente de Trabalho na temperatura do banho-maria (37°C). A temperatura deve permanecer constante durante a realização do teste.

2- Pipetar:

Reagente de Trabalho	1000 μL
Amostra	50 μL

3- Homogeneizar e inserir a cubeta no porta-cubetas termostatizado (37°C). Acionar o cronômetro.

4- Após 1 minuto, fazer a leitura da absorbância inicial (A_1).

5- Fazer novas leituras de absorbância, após exatamente 1, 2 e 3 minutos.

6- As diferenças entre as absorbâncias devem ser praticamente iguais, indicando a linearidade do método.

7- Calcular o decréscimo de absorbância médio por minuto ($\Delta A/\text{minuto médio}$).

Procedimento em Analisadores Automáticos

Mencionar o manual ou POP para utilização do equipamento analítico. Anexar o guia de aplicação dos reagentes para o sistema automático.

CÁLCULOS

Ver Linearidade.

Considerando que o coeficiente de absorção milimolar do NADH em 340 nm é 6,3, tem-se a seguinte fórmula para calcular a atividade enzimática:

U/L de AST (GPT) em 340 nm = $\Delta A/\text{min} \times 3333$ onde: ΔA A/min = Variação da absorbância por minuto

O fator 3333 é calculado com base nas condições da reação cinética contínua. Esse fator deve ser recalculado sempre que se fizer qualquer modificação nos parâmetros da reação.

Exemplo: $\Delta A/\text{minuto do teste} = 0,0335$ **Atividade AST em U/L = ΔA teste X 3333**

Atividade AST = 0,0335 X 3333 = 112 U/L

Cálculo do Fator:

$$Fator = \frac{V_t \times 1000}{\epsilon \times V_a \times d}$$

Exemplo: V_t = volume total do ensaio (1,05 mL) V_a = volume da amostra (0,05 mL)

1000 = conversão de U/mL para U/L d = espessura da solução (1 cm)

ϵ = Absortividade milimolar do NADH em 340nm = 6,3

$$Fator = \frac{1,05 \times 1000}{6,3 \times 0,05 \times 1} = 3333$$

Efeito da Temperatura:

A determinação pode ser feita também 30°C (Método IFCC).

O fator 1,54 permite converter resultados obtidos em 37°C para 30°C.

Exemplo: **Valor obtido em 37°C = 112 U/L** **Valor em 30°C = 112/1,54 = 73 U/L.**

RESULTADOS

Unidade de Medida: **U/L**

Fator de Conversão de Unidades (U/L para SI): U/L de AST x 0,01667 = $\mu\text{kat/L}$

CONTROLE DA QUALIDADE

Materiais

Identificar os materiais de controle interno e externo da qualidade, citando fabricante e número de catálogo.

Controle Interno

Descrever a calibração periódica de pipetas, equipamentos utilizados, controle de temperatura ambiente e geladeiras para armazenamento dos kits.

Citar a utilização de soros controles (nível normal –código ----- e patológico – código -----) nas análises realizadas juntamente com a frequência da utilização dos mesmos. Descrever o procedimento de verificação de novos lotes de controles e reagentes.

Citar POP para controle interno.

Controle Externo

Descrever os procedimentos utilizados nas avaliações de qualidade feitas por programas de comparação entre laboratórios ou outros controles de qualidade: PNCQ-SBAC e/ou PELM-SBPC

Gerenciamento dos Dados Obtidos no Controle Interno e Externo

Definir como os dados de controle são arquivados e gerenciados.

Fazer referência ao manual ou POP de garantia da qualidade.

VALORES DE REFERÊNCIA (37°C)

- **Soro ou Plasma:** até 42 U/L.

SIGNIFICADO CLÍNICO

A aspartato aminotransferase (AST) ou transaminase glutâmico-oxalacética (GOT ou TGO) é uma enzima encontrada em concentração muito alta no músculo cardíaco, no fígado, músculos esqueléticos e em menor concentração nos rins e pâncreas. Nas células hepáticas, a AST localiza-se no citoplasma (40%) e na mitocôndria (60%). Qualquer lesão tissular ou doença afetando o parênquima hepático liberará uma maior quantidade da enzima para a corrente sanguínea, elevando os níveis séricos da AST. Sempre que ocorrer uma lesão hepatocelular de qualquer etiologia haverá uma grande liberação da enzima AST para a corrente sanguínea, elevando seus níveis séricos.

Na hepatite virótica aguda, os níveis de AST encontram-se quase sempre elevados em mais de 10 vezes o limite superior da faixa de referência e em alguns casos ultrapassam a 20 vezes esse limite superior de normalidade. Entretanto, dentro de uma a duas semanas, os valores de AST diminuem bastante podendo cair para a faixa normal ou apresentar ligeiro aumento.

Nos casos de obstrução extra-hepática, as elevações de AST não são comuns, mas podem ocorrer quando há lesão parenquimatosa secundária aguda. Na cirrose, as alterações da AST e seus respectivos níveis vão depender da ocorrência e do grau de lesão hepatocelular ativo presente. Geralmente, na cirrose inativa os valores de AST não se alteram. Na cirrose alcoólica ativa, os valores de AST se elevam moderadamente.

Na hepatite virótica crônica ativa, os níveis de AST também se encontram elevados moderadamente. Várias doenças comuns apresentam elevação pequena ou moderada de AST, e entre elas podemos citar: mononucleose infecciosa, hepatite aguda na fase de remissão ou recuperação, hepatite crônica, disfunção hepática induzida por drogas, tumor hepático metastático, congestão hepática passiva, cirrose ativa ou hepatopatia alcoólica, obstrução extra-hepática prolongada do ducto biliar, fígado gorduroso e citomegalovirus.

Na maioria das vezes, a dosagem de AST é realizada juntamente com a ALT e a relação AST/ALT pode ser determinada para auxiliar no diagnóstico diferencial das doenças. Assim, a relação AST/ALT é sempre maior do que 1 em pacientes com cirrose alcoólica, hepatites crônicas, congestão hepática e tumor metastático do fígado. Geralmente, essa relação é menor do que 1 nos casos de hepatite virótica aguda e mononucleose infecciosa.

Nos casos de lesão do miocárdio, a AST juntamente com a dosagem da creatina quinase (CK) e da desidrogenase láctica (LDH) é muito útil para o diagnóstico e acompanhamento do infarto do miocárdio (IM). Os níveis de AST aumentam dentro de 6 a 10 horas após o infarto, atingindo um valor máximo em 12 a 48 horas, voltando aos níveis normais em 3 a 4 dias, se não ocorrer novo infarto. Portanto, as determinações em série da AST como da CK, são muito úteis para a avaliação do infarto do miocárdio. A AST é muito menos específica do que a CK-MB para o diagnóstico do infarto do miocárdio.

Nos casos de pericardite, angina e cardite reumática não há aumento dos níveis de AST.

Valores elevados: Os valores elevados de AST são mais comumente encontrados nas seguintes patologias: hepatites, cirrose hepática, necrose hepática, metástase hepática, drogas hepatotóxicas, processo infiltrativo hepático (tumor), infarto do

miocárdio, operações cardíacas, angioplastia e cateterização cardíaca, pancreatite aguda, trauma muscular esquelético, queimaduras graves, anemia hemolítica aguda, distrofia muscular progressiva, mononucleose infecciosa com hepatite, doenças musculares primárias (miopatia, miosite), doença renal aguda e convulsões recentes.

LINEARIDADE E LIMITE DE DETECÇÃO

Linearidade

A reação é linear até um $\Delta A/\text{minuto}$ de 0,150 = 500 U/L. Para valores maiores, diluir a amostra com NaCl 0,9 g% e repetir a determinação. Multiplicar o valor obtido pelo fator de diluição.

Limite de detecção

O Limite de detecção do kit foi verificado no comprimento de onda de 340 nm, sendo que a alteração mínima da atividade detectável foi de 1,1 U/L. O intervalo de medida vai de 1,1 U/L até 500 U/L.

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Os resultados deverão ser usados em conjunto com informações disponíveis da avaliação clínica e outros procedimentos diagnósticos.

Interferências:

Não utilizar amostras hemolisadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW. Clin Chem 1978; 24:58.
- 2- Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Fundamento de Química Clínica, 4ª Ed - Guanabara Koogan; 1998.
- 3- Gella FJ et al. Clin Chim Acta 1985; 153-241-247.
- 4- IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. J Clin Chem Clin Biochem 1986; 24:497-510.
- 5- Karmen A. J Clin Invest 1955; 34:131.

- 6- Lopes HJJ. Enzimas no Laboratório Clínico-Aplicações Diagnósticas. BH, Analisa Diagnóstica, 1998.
- 7- Sociedad Española de Quím. Clín, Comité Científico, Com. de Enzimas. Quim Clin 1987; 6: 241-244.
- 8- AST-PP, Instruções de Uso, Gold Analisa Diagnóstica.

APÊNDICE B: Beta Endorfina

Beta Endorphin

Catalog No. OP-201

NAME AND INTENDED USE

The HOPE MICROWELL ELISA b-Endorphin, Catalog No. OP-501, is for use in the quantitative measurement of b-Endorphin.

PRINCIPLE OF THE TEST

HOPE Microwell ELISA b-Endorphin is a competitive sandwich ELISA. The microwells are coated with a second antibody goat rabbit IgG. A certain amount of rabbit anti b-Endorphin (Antibody solution) is added to incubate with standard or specimens. Then a b-Endorphin-HRP enzyme conjugate is added to compete with b-Endorphin in the solution to bind to limited binding sites on the primary rabbit anti-b-Endorphin antibody on the solid phase. After washing, substrate (solution A) and chromogen (solution B) are added to develop a color. The enzyme reaction is stopped by addition of acid. The color intensity which is proportional to enzyme conjugate is inversely proportional to the concentration of b-Endorphin in specimen and standards. The b-Endorphin concentration of specimen run concurrently with standards can be determined from the standard curve.

MATERIALS PROVIDED

- Microwell strips: goat anti rabbit IgG coated microwells (12 strips x 8 wells)
- Solution A: Enzyme substrate, H₂O₂, 1 vial (7 ml)
- Solution B: Chromogen, Tetramethylbenzidine, 1 vial (7 ml)
- Enzyme Conjugate Stock Solution (50X): Horseradish peroxidase conjugated b-Endorphin. 1 vial (150 ml)
- Antibody solution: Rabbit anti- b-Endorphin antibody 1 vial (7 ml)
- Standard stock solution: b-Endorphin 16 ng/ml 1 vial (2 ml)
- Sample diluent: 0.02 phosphate buffer pH 7.6 contains 0.15 M NaCl, 0.01 M EDTA, 0.5% BSA, and 0.02 % Triton X-100. 1 vial (12 ml)
- Washing Concentrate (10x): 1 bottle (50 ml)
- Conjugate Diluent: 1 vial (7 ml)
- Stop solution: 2N HCl 1 vial (12 ml)

STORAGE AND STABILITY

- Store the kit at 2 - 8°C.
- Keep microwells sealed in a dry pouch with desiccants.
- The reagents are stable until expiration of the kit.
- Do not expose test reagents to heat, sun or strong light during storage or usage.

PREPARATION FOR ASSAY

- Bring all reagents and specimens to room temperature (20-25 °C) and gently swirl to obtain thorough mixing.
- Preparation of washing buffer: Dilute washing concentrate (10X) with deionized water to a final volume of 500 ml.
- Preparation of standard set: Dilute stock standard 16 ng/ml to a series of desirable concentration of b-Endorphin with sample diluent.
- Preparation of conjugate working solution: Dilute 20 ml of conjugate stock solution into 1 ml of conjugate diluent. It is enough for 2 strips of wells.

ASSAY PROCEDURE:

- Place the desirable number of coated wells into the holder.
- Dispense 25 ml of standards or specimens into each well.
- Add 50 ml of antibody solution into each well and tap 5-10 times gently to ensure a complete mixing. Incubate 30 minutes at room temperature.
DO NOT wash between step 3 and step 4
- Add 50 ml of b-Endorphin HRP enzyme conjugate to each well, tap 5-10 times gently and continue to incubate for 60 minutes at room temperature.
- Wash each well 5 times with 1X washing solution. Make sure no water droplets remain inside each well.
- Dispense 50 ml of solution A and 50 ml solution B to each well and incubate for 30 minutes.
- Stop reaction with 100 ml stop solution.
< strong>
- Read O.D. at 450 nm with a microwell reader.

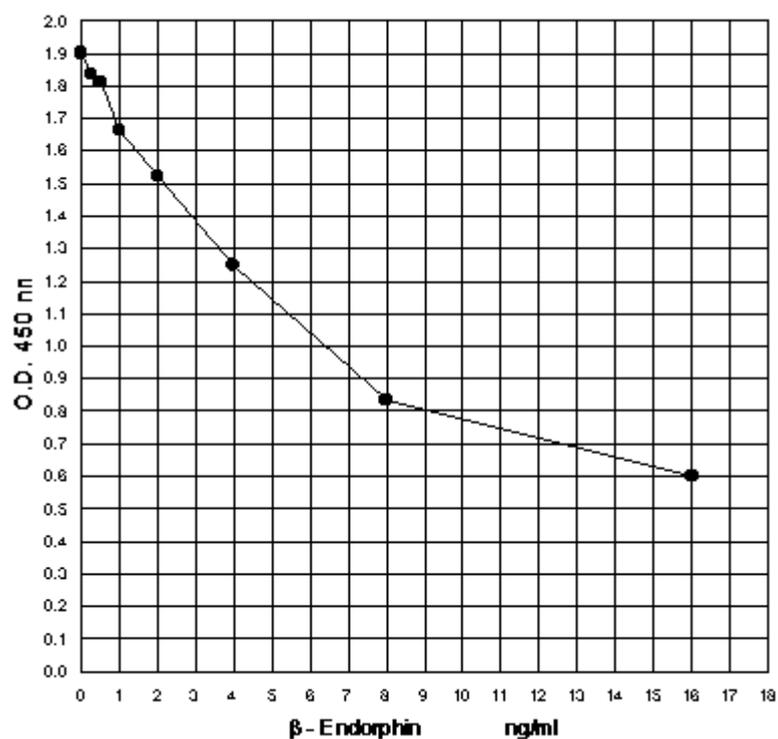
PROCEDURE NOTE

- It is important to wash microwells thoroughly and remove the last droplets of washing buffer to achieve the best results.
- Absorbance is a function of time and temperature of incubations. It is recommended to have all reagents and sample caps removed and all needed wells assigned and secured in holder. It will ensure the equal elapsed time for each pipetting without interruption.

CALCULATION OF RESULTS

- Construct a standard curve by plotting OD 450 nm on y-axis against the standard concentration of b-Endorphin ng/ml on x-axis. Draw a smooth curve line through the points, rejecting grossly aberrant points.
- Use the absorbance values obtained for specimens to interpolate their b-Endorphin concentration from the resulting standard curve.
- An example of a typical run:

Beta - Endorphin (ng/ml)	Net O.D. 450nm		Ave	% Inhibition
	1	2		
0.0	1.902	1.900	1.901	100
0.3	1.830	1.840	1.835	96.5
0.5	1.821	1.800	1.811	95.3
1.0	1.679	1.650	1.665	87.5
2.0	1.518	1.525	1.522	80.0
4.0	1.247	1.250	1.249	65.6
8.0	0.839	0.830	0.835	43.7
16.0	0.604	0.600	0.602	31.7



PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity Dynamic range: 0.20 ~ 20 ng/ml

Specificity Cross reaction based on radioimmunoassay.

Peptide	% crossreactivity
Beta-endorphin (1-30)	<0.06
Beta-endorphin (1-29)	<0.06
Beta-endorphin (1-28)	0.1
Leu-enkephalin	0.0
Met-enkephalin	0.0
Dynorphin A (1-17)	0.0

REFERENCES:

Tseng, L.F. Towell, J.F. & Fujimoto, J.M. (1986a). Release of immunoreactive Met-enkephalin by intraventricular b-endorphin in anesthetized rats. *Regulatory Peptides*, 14(3), 181-92.

Tseng, L.F. Towell, J.F. & Fujimoto, J.M. (1986b). Spinal release of immunoreactive Met-enkephalin by intraventricular b-endorphin and its analogs in anesthetized rats. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 237(1), 65-74.

Bach, F.W. & Yaksh, T.L. (1995b). Release of b-endorphin immunoreactivity from brain by activation of a hypothalamic N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuroscience*, 65(3), 775-83.

Bach, F.W. & Yaksh, T.L. (1995c). Release of b-endorphin immunoreactivity into ventriculo-cisternal perfusate by lumbar intrathecal capsaicin in the rat. *Brain Research*, 701(1-2), 192-200.

Cui, Y. Lee, T.F. & Wang, L.C. (1996). In vivo microdialysis study on changes in septal dynorphin and b-endorphin activities in active and hibernating Columbian ground squirrels. *Brain Research*, 710(1-2), 271-4.

APÊNDICE C: Cálcio

CÁLCIO-PP

CAT. 448M: Padrão: 1 x 5 mL

Tampão: 1 x 50 mL

Metiltimol: 1 x 50 mL

CAT. 448: Padrão: 1 x 5 mL

Tampão: 2 x 50 mL

Metiltimol: 2 x 50 mL

Método: Colorimétrico - Azul de Metiltimol.

Finalidade: Dosagem do Cálcio.

Amostra: Soro, Plasma, Urina.

Bireagente - Necessita preparar Reagente de Trabalho.

Estabilidade do Reagente de Trabalho: 2 dias.

Tempo de Reação: 2 minutos à temperatura ambiente.

Linearidade: 15,0 mg/dL.

CÁLCIO**PRINCÍPIO DO TESTE**

O cálcio presente na amostra reage com o azul de metiltimol em meio alcalino, originando um complexo colorido que é quantificado espectrofotometricamente em 610 nm.

A hidroxiquinoleína presente no reativo evita a interferência do magnésio.

**APLICAÇÃO CLÍNICA**

A dosagem do Cálcio no sangue, urina e outros líquidos biológicos é empregada principalmente para avaliar o metabolismo do cálcio. Valores altos são encontrados no hiperparatireoismo, hipervitaminose D, doença de Paget e doenças malignas com comprometimento ósseo. Valores baixos são encontrados no hipoparatireoidismo, deficiência de vitamina D, nefropatias, má absorção intestinal, osteomalácia e transfusões maciças.

AMOSTRA

Preparo do Paciente

Colher sangue pela manhã após jejum de 8 horas, salvo orientações médicas.

Amostras utilizadas

Soro, plasma (heparinizado) ou urina de 24 horas.

Devido ao aumento da permeabilidade das hemácias ao cálcio, separar o soro ou plasma até uma hora após a colheita.

Estabilidade e armazenamento da amostra

O analito no soro ou plasma é estável por 10 dias entre 2-8°C.

Na urina de 24 horas, coletada com 10 mL de ácido nítrico a 50% (v/v), o analito é estável por 10 dias entre 2-8°C.

Volume ideal utilizado para análise

(Definir o volume ideal a ser encaminhado para análise).

Volume mínimo utilizado para análise

(Definir o volume mínimo a ser encaminhado para análise).

Critérios para rejeição da amostra

A urina de 24 horas deve ser colhida com 10 mL de ácido nítrico a 50% (v/v).

Fazer referência ao manual ou POP de coleta, separação e distribuição de material.

REAGENTE UTILIZADO

CÁLCIO PP

CAT. 448

MS 80022230080

GOLD ANALISA DIAGNÓSTICA LTDA

CNPJ – 03.142.794/0001-16

Av. Nossa Senhora de Fátima, 2363

Belo Horizonte – MG – Brasil

Farmacêutico Responsável: Homero Jackson de Jesus Lopes

CRF – MG - 2010

Componentes do kit:

Conservar em temperatura ambiente (15-30°C).

1. **Padrão** - Contém Cálcio 10 mg/dL.
2. **Tampão** - Contém cianeto de potássio 7,7 mmol/L e etanolamina 1,5 mol/L. Tóxico.
3. **Metiltimol** - Contém azul de metiltimol 0,1 mmol/L, ácido clorídrico 10 mmol/L e 8-hidroxiquinoleína 17 mmol/L.

PREPARO DO REAGENTE DE TRABALHO

De acordo com o número de testes, misturar volumes iguais do Tampão (2) com o Metiltimol (3). Homogeneizar bem. Estável por 2 dias entre 2-8°C

Cuidados e Precauções Especiais

- 1- O kit destina-se somente para uso diagnóstico *in vitro*.
- 2- Aplicar os cuidados habituais de segurança na manipulação dos reagentes e amostra biológica. Fazer referência ao manual ou POP de segurança.
- 3- Os reagentes utilizados em condições técnicas adequadas e armazenados nas condições especificadas são estáveis até a validade citada na embalagem.
- 4- O reagente uma vez usado contém soro, plasma ou urina, eventualmente infectado, e deve ser tratado como material potencialmente infeccioso. Fazer o descarte em lugar apropriado.
- 5- O Tampão contém cianeto de potássio. Veneno. Reagente tóxico. Nunca pipetar com a boca. Em caso de vazamento acidental, lavar o local com bastante água corrente.
- 6- Recomenda-se o uso de luvas descartáveis durante o manuseio das substâncias. Em caso de contato com os olhos ou pele, lavar abundantemente com água corrente. Em caso de ingestão, procurar atendimento médico.

EQUIPAMENTOS**Procedimento Técnico Manual**

- Espectrofotômetro ou fotômetro para leituras em 610 nm
- Pipetas automáticas

- Cronômetro
- Temperatura: ambiente (15-30°C)

Procedimento Técnico Automatizado

Citar nome, modelo e o local onde se encontra o equipamento; Fazer referência ao manual ou POP para utilização do mesmo.

Procedimento Técnico Alternativo

Citar o equipamento alternativo e os procedimentos para medição dos ensaios. Indicar as possíveis diferenças quando os procedimentos manuais substituírem os procedimentos automatizados.

PROCEDIMENTO

Procedimento Manual:

1- Identificar 3 tubos de ensaio com "Branco", "Teste" e "Padrão" e proceder:

Tubos	Branco	Teste	Padrão
Amostra	—	10 µL	—
Padrão (1)	—	—	10 ·L
Reagente de Trabalho	1000 µL	1000 µL	1000 µL

2- Misturar bem e deixar os tubos durante 2 minutos à temperatura ambiente.

3- Ler a absorbância (Ap) do Padrão e do Teste (At), zerando o aparelho com o Branco em 610 nm.

4- A cor é estável durante 60 minutos.

Dosagem em Amostras de Urina

Diluir a amostra de urina 1:10 (0,1 mL de urina + 0,9 mL de água destilada ou deionizada). Seguir a técnica de análise descrita para o soro e multiplicar o resultado obtido por 10.

Procedimento em Analisadores Automáticos:

Mencionar o manual ou POP para utilização do equipamento analítico. Anexar o guia de aplicação dos reagentes para o sistema automático.

CÁLCULOS

Ver linearidade.

Como a metodologia obedece a Lei de Lambert-Beer, podem-se efetuar os cálculos através do Fator de Calibração (FC).

Concentração do Padrão = C_p Absorbância do Padrão = A_p

Concentração do Teste = C_t Absorbância do Teste = A_t

Exemplo: $C_p = 10,0 \text{ mg/dL}$ $A_p = 0,250$ $A_t = 0,220$

$$F_c = \frac{C_p}{A_p} = \frac{10,0}{0,250} = 40$$

$$C_t = F_c \times A_t = 40 \times 0,220 = 8,8 \text{ mg/dL}$$

Dosagem na Urina (mg/24 horas):

$$\text{mg/24 horas} = \frac{\text{Cálcio (mg/dL)} \times \text{Volume Urinário de 24h em mL}}{100}$$

CÁLCIO IONIZADO (CaI):

Ca = Cálcio sérico (mg/dL) P = Proteína total (g/dL) A = Albumina (g/dL)

$$\text{CaI (mg/dL)} = \frac{6 \times Ca - \left(\frac{(0,19 \times P) + A}{3} \right)}{(0,19 \times P) + A + 6}$$

RESULTADOS

Unidade de Medida

mg/dL

Fator de Conversão de Unidades (mg/dL para SI)

mg/dL de cálcio x 0,25 = mmol/L de Cálcio

CONTROLE DA QUALIDADE

Materiais

Identificar os materiais de controle interno e externo da qualidade, citando fabricante e número de catálogo.

Referenciar POP para limpeza e secagem dos materiais utilizados.

Controle Interno

Descrever a calibração periódica de pipetas, equipamentos utilizados, controle de temperatura ambiente e geladeiras para armazenamento dos kits.

Citar a utilização de soros controles (nível normal –código ----- e patológico – código -----) nas análises realizadas juntamente com a frequência da utilização dos mesmos. Descrever o procedimento de verificação de novos lotes de controles e reagentes.

Citar POP para controle interno.

Controle Externo

Descrever os procedimentos utilizados nas avaliações de qualidade feitas por programas de comparação entre laboratórios ou outros controles de qualidade: PNCQ-SBAC e/ou PELM-SBPC

Gerenciamento dos dados obtidos no Controle Interno e Externo

Definir como os dados de controle são arquivados e gerenciados.

Fazer referência ao manual ou POP de garantia da qualidade.

VALORES DE REFERÊNCIA

Soro ou plasma:

- **Cálcio:** 9,0 a 10,7 mg/dL (2,25 a 2,68 mmol/L)
- **Cálcio Ionizado:** 4,0 a 5,4 mg/dL (1,00 a 1,35 mmol/L)

Urina: 100 a 350 mg/24 horas = 2,5 a 8,8 mmol/24 horas.

SIGNIFICADO CLÍNICO

A dosagem de cálcio no soro é empregada para avaliar a função da paratireóide e o metabolismo do cálcio, uma vez que o cálcio sérico é mantido dentro dos limites fisiológicos pela ação combinada do paratormônio (PTH) e vitamina D através de seus efeitos sobre os ossos, intestinos e rins. Cerca de metade do cálcio total existe no sangue em sua forma livre (ionizado) e a outra metade encontra-se combinada com proteínas, principalmente com a albumina. A dosagem do cálcio avalia as duas formas, livre e combinado. O cálcio ionizado pode ser determinado através de técnicas de eletrodo íon-seletivo ou pode ser calculado através de fórmula específica. A vantagem de se dosar o cálcio ionizado é evitar a interferência dos níveis de albumina.

Valores Aumentados

A hipercalcemia ocorre no hiperparatireoidismo, neoplasmas com metástase óssea, alguns casos de câncer de pulmão, rins, bexiga sem envolvimento ósseo, hipervitaminose D, sarcoidose, mieloma múltiplo quando as proteínas estão elevadas, acromegalia, doença de Paget.

A hipercalcemia está associada ao uso de drogas como os tiazídicos, vitaminas A e D, antiácidos alcalinos e carbonato de lítio.

Valores Diminuídos

As causas mais comuns de hipocalcemia são: hipoparatiroidismo idiopático ou cirúrgico; pseudo hipoparatiroidismo; insuficiência renal; deficiência de vitamina D; doença gastrointestinal que interfere com a absorção de vitamina D ou cálcio (esteatorréia); nefrose ou outras condições com baixos níveis de proteínas séricas; pancreatite aguda; deficiência de magnésio.

VALORES CRÍTICOS

Soro ou plasma: > 12,0 mg/dL
< 7,0 mg/dL

Incluir o procedimento a ser adotado diante de um resultado crítico.

LINEARIDADE E LIMITE DE DETECÇÃO

Linearidade

A reação é linear até 15,0 mg/dL (3,75 mmol/L). Para valores acima da faixa linear, diluir a amostra com água destilada ou deionizada, realizar nova determinação e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição empregado.

Limite de detecção

O Limite de detecção do kit foi realizado em 610 nm e a alteração mínima detectável foi de 0,6 mg/dL. O intervalo de medida vai de 0,6 mg/dL até 15 mg/dL.

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Os resultados deverão ser usados em conjunto com informações disponíveis da avaliação clínica e outros procedimentos diagnósticos.

Interferências:

Os anticoagulantes quelantes de cálcio (EDTA, oxalato, etc) interferem, fornecendo resultados falsamente diminuídos.

Devido ao aumento da permeabilidade das hemácias ao cálcio, separar o soro ou plasma até uma hora após a colheita.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Glindler M, King JD, Am J. Clin. Path 1972; 58; 376.
- 2- Barnett RN et al. Am. J. Clin. Path. 1973; 59:836.
- 3- Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Fundamentos de Química Clínica, 4^a Ed Guanabara Koogan; 1998.
- 4- Michaylova V et al Anal Chim Acta 1971;53:194.
- 5- Morin LG. Am J Clin Pathol 1974;61:114.
- 6- Pottgen P, Davis ER. Clin Chem 1976;22:1752.
- 7- CÁLCIO-PP, Instruções de Uso, Gold Analisa Diagnóstica.

APÊNDICE D: Fósfatase Alcalina

FOSFATASE ALCALINA - CAT. 340

Padrão: 1 x 3 mL

Substrato: 1 x 5 mL

Tampão: 1 x 50 mL

Reagente de Cor: 1 x 200 mL

Método: Cinético-Colorimétrico (Roy mod.).

Finalidade: Dosagem da Fosfatase Alcalina.

Amostra: Soro, Plasma.

Estabilidade dos Reagentes: Até a data de validade do kit.

Tempo de Reação: 12 minutos a 37° C.

Linearidade: 600 U/L.

FOSFATASE ALCALINA

PRINCÍPIO DO TESTE

A fosfatase alcalina do soro hidrolisa o substrato de timolftaleína monofosfato, liberando timolftaleína e fosfato inorgânico. Pela adição de álcali, a ação enzimática é inibida e a timolftaleína adquire cor azul, cuja absorbância é medida fotometricamente.

A cor do produto final da reação é resultante da mistura de cor azul e a cor própria do substrato.

APLICAÇÃO CLÍNICA

A dosagem da Fosfatase Alcalina no soro é empregada principalmente para avaliar doenças hepáticas (hepatites, cirrose, câncer, icterícias obstrutivas) e doenças ósseas.

AMOSTRA

Preparo do Paciente

Colher sangue pela manhã após jejum de 8 horas, salvo orientações médicas.

Amostras utilizadas

Soro ou plasma (heparina).

Estabilidade e armazenamento da amostra

O analito é estável por 7 dias entre 2-8°C.

Volume ideal utilizado para análise

(Definir o volume ideal a ser encaminhado para análise).

Volume mínimo utilizado para análise

(Definir o volume mínimo a ser encaminhado para análise).

Critérios para rejeição da amostra

Os anticoagulantes fluoretos, oxalato, citrato e EDTA interferem no resultado do teste.

A hemólise interfere devido à fosfatase alcalina eritrocitária.

Fazer referência ao manual ou POP de coleta, separação e distribuição de material.**REAGENTE UTILIZADO**

FOSFATASE ALCALINA

CAT. 340

MS 80022230142

GOLD ANALISA DIAGNÓSTICA LTDA

CNPJ – 03.142.794/0001-16

Av. Nossa Senhora de Fátima, 2363

Belo Horizonte – MG – Brasil

Farmacêutico Responsável: Homero Jackson de Jesus Lopes CRF – MG - 2010

Componentes do kit:

Conservar em temperatura ambiente (15-30 °C).

1- Padrão - Contém timolftaleína equivalente a 40 U/L.

2- Substrato - Contém timolftaleína monofosfato de magnésio 39 mmol/L e dioxano 80%.

3- Tampão - Contém dietanolamina 300 mmol/L pH 10,15; Brij 35 2,1 g/L.

4- Reagente de Cor - Contém hidróxido de sódio 100 mmol/L e carbonato de sódio 150 mmol/L. Corrosivo.

Estabilidade

Os reativos são estáveis até o vencimento da data de validade impressa no rótulo do produto e na caixa quando conservados bem vedados na temperatura recomendada. Evitar a contaminação durante o uso.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES ESPECIAIS:

- 1- O kit destina-se somente para uso diagnóstico *in vitro*.
- 2- Aplicar os cuidados habituais de segurança na manipulação dos reagentes e amostra biológica. Fazer referência ao manual ou POP de segurança.
- 3- Recomendamos o uso das Boas Práticas em Laboratório Clínico para a execução do teste.
- 4- De acordo com as instruções de biossegurança, todas as amostras devem ser manuseadas como materiais potencialmente infectantes.
- 5- O Tampão (3) deve ser mantido aberto o menor tempo possível, para não ser contaminado com CO₂ atmosférico. Não soprar dentro do frasco do Tampão (3) para evitar alterar o pH da solução pela introdução de CO₂.
- 6- O frasco do Padrão (1) deve ser mantido bem vedado para evitar a evaporação do solvente.
- 7- O Reagente de Cor (4) é corrosivo. Contato com os olhos, pele ou mucosas devem ser evitados. Não aspirar ou ingerir.
- 8- Glicose e glicerol aumentam a atividade da enzima, atuando como aceptores de fosfatos.
- 9- Descartar os reagentes e as amostras de acordo com as resoluções normativas locais, estaduais e federais de preservação do meio ambiente.
- 10- Recomendamos o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) como avental, óculos de segurança, luvas descartáveis e outros que se fizerem necessários para a realização do teste.
- 11- Não deve ser utilizada a boca para pipetagem de reagentes, amostra ou qualquer outra substância.
- 12- A observação rigorosa da pipetagem, da estabilidade dos reagentes e da limpeza da vidraria é de extrema importância para se obter resultados exatos e precisos.

EQUIPAMENTOS

Procedimento Técnico Manual

- Banho-Maria a 37°C
- Espectrofotômetro para leituras em 590 nm
- Pipetas automáticas
- Cronômetro

Procedimento Técnico Automatizado

Citar nome, modelo e o local onde se encontra o equipamento; Fazer referência ao manual ou POP para utilização do mesmo.

Procedimento Técnico Alternativo

Citar o equipamento alternativo e os procedimentos para medição dos ensaios. Indicar as possíveis diferenças quando os procedimentos manuais substituírem os procedimentos automatizados.

PROCEDIMENTO**Procedimento Técnico Manual:****A- Condições de Reação**

Equipamento: Espectrofotômetro.

Leitura: Comprimento de onda 590 nm.

Medida: Contra o Branco da reação.

B- Dosagem no Soro ou Plasma.

Identificar três tubos de ensaio Branco, Teste e Padrão e proceder:

Tubos	Branco	Padrão	Teste
Substrato (2)	50 µL	50 µL	50 µL
Tampão (3)	500 µL	500 µL	500 µL
Padrão (1)	-----	50 µL	-----

Misturar e incubar a 37°C por 2 minutos.

Soro	-----	-----	50 µL
------	-------	-------	-------

Homogeneizar bem e Incubar a 37°C por 10 minutos (**CRONOMETRAR**)

Reagente de Cor (43)	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
----------------------	--------	--------	--------

Homogeneizar bem.

Efetuar as leituras fotométricas em 590 nm ou em filtro vermelho, acertando o zero com o Branco.

A reação de cor é estável por 120 minutos.

Procedimento em Analisadores Automáticos

Mencionar o manual ou POP para utilização do equipamento analítico. Anexar o guia de aplicação dos reagentes para o sistema automático.

CÁLCULOS

Ver Linearidade.

At = Absorbância do Teste

Ap = Absorbância do Padrão

Cp = Concentração do Padrão = 40 U/L

Como a metodologia obedece a Lei de Lambert-Beer, fazer os cálculos através do Fator de Calibração.

Exemplo:

Ap = 0,292 At = 0,420 Cp = 40 U/L

FC = Cp ÷ Ap = 40 ÷ 0,292 = 137

Ct em U/L = At x FC = 0.420 x 137 = 57 U/L

RESULTADOS

Unidade de Medida

U/L

Definição de Unidade: Uma unidade é igual a quantidade de enzima que libera por hidrólise 1 micromol de timolftaleína por minuto, por litro de soro nas condições do teste.

Fator de Conversão de Unidades (U/L para SI)

U/L de Fosfatase Alcalina x 0,01667 = μ kat/L

CONTROLE DA QUALIDADE

Materiais

Identificar os materiais de controle interno e externo da qualidade, citando fabricante e número de catálogo.

Referenciar POP para limpeza e secagem dos materiais utilizados.

Controle Interno

Descrever a calibração periódica de pipetas, equipamentos utilizados, controle de temperatura ambiente e geladeiras para armazenamento dos kits.

Citar a utilização de soros controles (nível normal –código ----- e patológico – código -----) nas análises realizadas juntamente com a frequência da utilização dos mesmos. Descrever o procedimento de verificação de novos lotes de controles e reagentes.

Citar POP para controle interno.

Controle Externo

Descrever os procedimentos utilizados nas avaliações de qualidade feitas por programas de comparação entre laboratórios ou outros controles de qualidade: PNCQ-SBAC e/ou PELM-SBPC

Gerenciamento dos dados obtidos no Controle Interno e Externo

Definir como os dados de controle são arquivados e gerenciados.

Fazer referência ao manual ou POP de garantia da qualidade.

VALORES DE REFERÊNCIA (37°C)

Os valores de referência variam em função da idade.

Soro ou plasma.

1- Adultos (acima de 13 anos): 13 a 43 U/L.

2- Crianças até 13 anos: 56 a 156 U/L.

SIGNIFICADO CLÍNICO

A fosfatase alcalina compreende um grupo de enzimas fosfohidrolases que apresentam atividade máxima em pH alcalino, próximo de 10. A enzima é

encontrada em vários tecidos, com maiores concentrações no fígado, no epitélio do trato biliar e no osso. A mucosa intestinal e a placenta contêm também a fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina apresenta várias isoenzimas, sendo que cada uma das fontes produtoras contém uma isoenzima específica. O fracionamento das isoenzimas da ALP é útil para diferenciar doenças ósseas de doenças hepáticas. As isoenzimas são melhor estudadas pelo teste de estabilidade ao calor e pelo fracionamento eletroforético. A isoenzima de origem hepática (ALP1) é termo-estável, enquanto que fração óssea (ALP2) é inativada pelo calor. A determinação laboratorial da fosfatase alcalina (ALP) se aplica muito bem para o diagnóstico de doenças do fígado e dos ossos.

Valores elevados: Cirrose, obstrução biliar intra e extra-hepático tumor primário ou metastático do fígado, tumor metastático do osso, recuperação de fraturas ósseas, doença de Paget, hiperparatireoidismo, fases de crescimento normal dos ossos.

Valores Diminuídos: Hipotireoidismo, hipofosfatemia, desnutrição, doença celíaca.

VALORES CRÍTICOS

Não Aplicável.

LINEARIDADE E LIMITE DE DETECÇÃO

Linearidade

A reação de cor é linear até a concentração de 600 U/L com cinética de ordem zero. Para valores maiores que 0,8 de absorbância, proceder da seguinte maneira:

- a) Diluir o conteúdo dos tubos Teste e o Branco com o Reagente de Cor (4),
 - b) Efetuar nova leitura fotométrica,
 - c) Multiplicar o valor obtido pelo fator de diluição empregado.
- Se o valor for ainda maior que 600 U/L:
- a) Diluir o soro com água destilada,
 - b) Efetuar nova determinação,
 - c) Multiplicar o valor obtido pelo fator de diluição empregado.

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Os resultados deverão ser usados em conjunto com informações disponíveis da avaliação clínica e outros procedimentos diagnósticos.

Interferências:

A presença de íons Ca^{++} , fosfato, amônio e borato inibem a enzima.

A hemólise interfere devido à fosfatase alcalina eritrocitária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- Amador, E.: J.A.M.A. 185, 431, 1970.

2- Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook Clinical Chemistry. Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1994;830-839.

3- Coleman C.M, Stroje RC. Clin Chim Acta 1966;13:401.

4- Kaplan A, Szabo LL, Opheim KE. Clinical Chemistry: Interpretation and Techniques. Philadelphia: Lea & Febiger 1988:190-191.

5- King EJ. J Path Bact. 1943;55:31.

6- Lopes HJJ. Enzimas no Laboratório Clínico-Aplicações Diagnósticas. BH, Analisa Diagnóstica, 2000.

7- Roy AV. Clin Chem 1970;16:431.

8- FOSFATASE ALCALINA, Instruções de Uso, Gold Analisa Diagnóstica.

FOSFORO - CAT. 342

Padrão: 1 x 3 mL

Redutor: 1 x 7 mL

Molibdato: 1 x 7 mL

Tampão: 1 x 14 mL

Método: Colorimétrico-Fosfomolibdato.

Finalidade: Dosagem do Fósforo (Fosfato).

Amostra: Soro, Plasma, Urina e Líquido Amniótico.

Estabilidade dos Reagentes: Até a data de validade do kit.

Tempo de Reação: 7 minutos `temperatura ambiente.

Linearidade: 9,0 mg/dL.

FÓSFORO

PRINCÍPIO DO TESTE

O íon fosfato (Pi) reage com o molibdato de amônio na presença de ácido sulfúrico formando um complexo de fosfomolibdato de amônio. Por ação do ácido ascórbico, em meio alcalino, o complexo formado é reduzido a azul de molibdênio, cuja absorvância medida em 650 nm, é diretamente proporcional à concentração de fósforo na amostra analisada.

APLICAÇÃO CLÍNICA

Valores Elevados – Hiperfosfatemia: A concentração de fósforo no soro está aumentada na insuficiência renal (aguda e crônica), no hipoparatiroidismo, hipervitaminose D, acromegalia, rabdomiólise, e nas situações de lise tumoral aguda (por exemplo, quimioterapia do linfoma). A hiperfosfatemia pode ocorrer após a administração de laxativos e enemas de retenção contendo fosfato.

Valores Diminuídos – Hipofosfatemia: A concentração de fósforo está diminuída na fase de absorção dos carboidratos (glicose e demais açúcares são fosforilados ao penetrar nas células).

A hipofosfatemia típica ocorre no: hiperparatiroidismo, raquitismo (deficiência de Vitamina D), esteatorreia, e em algumas doenças com deficiente reabsorção tubular do fosfato (Síndrome de Fanconi).

AMOSTRA

Preparo do Paciente

Colher sangue pela manhã após jejum de 8 horas, salvo orientações médicas.
Devido a liberação do fósforo hemático, separar o soro até 1 hora após a colheita.

Amostras utilizadas

Soro, plasma (heparina), urina e líquido amniótico.
Plasmas com citrato, oxalato, fluoreto e EDTA fornecem resultados falsamente diminuídos.
A urina deve ser acidificada com HCl e a estabilidade é até 6 meses entre 2 a 8°C.

Estabilidade e armazenamento da amostra

O analito é estável 2 dias entre 15-25°C e uma semana entre 2-8°C.

Volume ideal utilizado para análise

(Definir o volume ideal a ser encaminhado para análise).

Volume mínimo utilizado para análise

(Definir o volume mínimo a ser encaminhado para análise).

Crítérios para rejeição da amostra

Não usar soros ou plasmas hemolisados.

Algumas substâncias elevam o valor do fósforo: antiácidos alcalinos, Vitamina D, tetraciclina, metilina e pituitarina. Outras diminuem: $Al(OH)_3$, insulina, éter anestésico e injeção de paratireóide.

Fazer referência ao manual ou POP de coleta, separação e distribuição de material.

REAGENTE UTILIZADO

FÓSFORO

CAT. 342

MS 80022230154

GOLD ANALISA DIAGNÓSTICA LTDA
CNPJ – 03.142.794/0001-16
Av. Nossa Senhora de Fátima, 2363
Belo Horizonte – MG – Brasil

Farmacêutico Responsável: Homero Jackson de Jesus Lopes CRF – MG - 2010

Componentes do kit

Conservar na temperatura ambiente, entre 15-30°C.

1- Padrão de 5,0 mg/dL - Contém fosfato monobásico de potássio 220 mg/L; ácido clorídrico 0,1 mol e azida sódica 7,7 mmol/L. Tóxico.

2- Redutor - Contém ácido ascórbico 57 mmol/L e glicerol 95%.

3- Molibdato - Contém molibdato de amônio 20 mmol/L e ácido sulfúrico 1,5 mol/L. Corrosivo.

4- Tampão - Contém carbonato de sódio 2,4 mol/L

Estabilidade

Os reativos são estáveis até o vencimento da data de validade impressa no rótulo do produto e na caixa quando conservados bem vedados na temperatura recomendada. Evitar a contaminação durante o uso.

O reagente Redutor (2) quando armazenado entre 2-8°C tem sua estabilidade aumentada.

Não trocar as tampas dos reagentes.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES ESPECIAIS:

1- O kit destina-se somente para uso diagnóstico *in vitro*.

2- Aplicar os cuidados habituais de segurança na manipulação dos reagentes e amostra biológica. Fazer referência ao manual ou POP de segurança.

3- Recomendamos o uso das Boas Práticas em Laboratório Clínico para a execução do teste.

4- De acordo com as instruções de biossegurança, todas as amostras devem ser manuseadas como materiais potencialmente infectantes.

5- O Padrão (1) contém azida sódica, que é tóxico e o reagente Molibdato (3) é corrosivo, portanto tomar cuidado na manipulação dos mesmos para evitar intoxicação e queimaduras. Havendo contato com a pele e olhos, lavar imediatamente com bastante água e procurar auxílio médico.

6- Descartar os reagentes e as amostras de acordo com as resoluções normativas locais, estaduais e federais de preservação do meio ambiente.

7- Recomendamos o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) como avental, óculos de segurança, luvas descartáveis e outros que se fizerem necessários para a realização do teste.

8- Não deve ser utilizada a boca para pipetagem de reagentes, amostra ou qualquer outra substância.

9- A observação rigorosa da pipetagem, da estabilidade dos reagentes e da limpeza da vidraria é de extrema importância para se obter resultados exatos e precisos.

10- Ao gotejar os reagentes: Redutor (2), Molibdato (3) e Tampão (4), colocar o conta-gotas na posição vertical e deixar as gotas caírem diretamente sobre os líquidos (no fundo do tubo), sem tocar as paredes dos tubos.

11- O tempo de 14 minutos da estabilidade da reação de cor deve ser criteriosamente observado.

12- O reagente Tampão (4) quando armazenado em baixa temperatura pode cristalizar-se. Aquecê-lo, alguns minutos em banho a 37°C e agitar até solubilização total.

EQUIPAMENTOS

Procedimento Técnico Manual

- Espectrofotômetro para leituras em 650 nm
- Pipetas automáticas
- Cronômetro

Procedimento Técnico Automatizado

Citar nome, modelo e o local onde se encontra o equipamento; Fazer referência ao manual ou POP para utilização do mesmo.

Procedimento Técnico Alternativo

Citar o equipamento alternativo e os procedimentos para medição dos ensaios. Indicar as possíveis diferenças quando os procedimentos manuais substituírem os procedimentos automatizados.

PROCEDIMENTO

Procedimento Técnico Manual

NOTA: O material usado no procedimento deve estar completamente isento de fósforo. É aconselhável utilizar material descartável ou lavado com ácido nítrico a 50 % (v/v). Na lavagem do material utilizar detergente não iônico, lavada com água corrente e enxaguada com água deionizada ou destilada, para evitar a obtenção de resultados incorretos pela contaminação com traços de ferro.

A- Condições de Reação

Equipamento: Espectrofotômetro.

Leitura: Comprimento de onda 650 nm.
Medida: Contra o Branco da Reação.

B- Técnica de Análise

Identificar 3 tubos de ensaio como Branco, Teste e Padrão e proceder:

Tubos	Branco	Teste	Padrão
Padrão	—	—	100 µL
Amostra	—	100 µL	—
Água deionizada	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Redutor (2)	1 gota	1 gota	1 gota
Molibdato (3)	1 gota	1 gota	1 gota

Misturar bem. Deixar reagir por 2 minutos na temperatura ambiente.

Tampão (4)	2 gotas	2 gotas	2 gotas
------------	---------	---------	---------

Agitar fortemente. Esperar 5 minutos na temperatura ambiente.
Imediatamente após, efetuar as leituras fotométricas do Padrão e Teste em 650 nm ou filtro vermelho, acertando o Zero de absorvância com o tubo Branco.
A reação de cor é estável por 14 minutos.

Procedimento em Analisadores Automáticos:

Mencionar o manual ou POP para utilização do equipamento analítico. Anexar o guia de aplicação dos reagentes para o sistema automático.

CÁLCULOS

Concentração do Padrão (Cp) = 5,0 mg/dL Concentração do Teste = Ct

Fator de Calibração (FC) = Cp ÷ Ap FC = 5,0 ÷ AP

Ap: Absorvância do Padrão At = Absorvância do Teste

Exemplo: $A_p = 0,194$ $A_t = 0,166$

$$FC = 5,0 \div 0,194 = 26$$

$$C_t = FC \times A_t = 26 \times 0,166 = 4,3 \text{ mg/dL}$$

DOSAGEM NA URINA

A. Preparo da Amostra

Homogeneizar a urina de 24 h e medir o seu volume em mL. Separar uma alíquota de 5 mL e aquecê-la a 56°C por 10 minutos. Filtrar a urina quando a amostra estiver turva por hematúria e/ou piúria. Acertar o pH da urina para 4 com HCl concentrado.

Efetuar uma diluição da urina a 1/10 com água destilada. Exemplo: 1,0 ml de urina + 9,0 ml de água destilada. No final, multiplicar o resultado obtido por 10.

B. Dosagem

Seguir as mesmas instruções para a dosagem no soro.

C. Cálculos

C_t em mg/dL é encontrado multiplicando o valor obtido na dosagem por 10 (diluição 1/10).

C_t em mg/24 h é encontrado multiplicando o valor obtido em mg/dL pelo volume de urinário de 24 horas e dividindo o resultado por 100.

$$\text{mg/24 horas} = (\text{mg/dL} \times \text{volume urinário em mL}) \div 100$$

Exemplo: Volume urinário de 24 h = 1300 mL

$$A_p = 0,194 \quad A_t = 0,237$$

$$FC = C_p \div A_p = 5,0 \div 0,194 = 26$$

$$C_t \text{ em mg/dL} = FC \times A_t \times 10 = 26 \times 0,237 \times 10 = 61 \text{ mg/dL}$$

$$\text{mg/24 horas} = (61 \times 1300) \div 100 = 794 \text{ mg/24 horas}$$

$$C_t = 794 \text{ mg/24 horas}$$

DOSAGEM DOS FOSFOLÍPIDES:

A- Extração

1. Em um tubo de centrífuga pipetar 2,7 mL de álcool isopropílico e adicionar 0,3 mL de soro gota a gota.
2. Misturar bem e esperar 5 minutos, na temperatura ambiente.
3. Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos.
4. Pipetar 1,0 mL de sobrenadante límpido, colocar em tubo de ensaio e evaporar em banho fervente até secagem completa.
5. Aquecer em chama até haver clareamento total da mistura (5 minutos).
6. Deixar esfriar, na temperatura ambiente.

B- Dosagem

1. Seguir as mesmas instruções para a dosagem no soro, omitindo a etapa de colocação da amostra (0,1 mL).

C- Cálculos

mg/dL de fosfolípides = $(At \div Ap) \times 125$

RESULTADOS

Unidade de Medida

mg/dL

Fator de Conversão de Unidades (mg/dL para SI)

Sistema Internacional de Unidades: mmol/L de Fósforo = mg/dL de Fósforo x 0,323

CONTROLE DA QUALIDADE

Materiais

Identificar os materiais de controle interno e externo da qualidade, citando fabricante e número de catálogo.

Referenciar POP para limpeza e secagem dos materiais utilizados.

Controle Interno

Descrever a calibração periódica de pipetas, equipamentos utilizados, controle de temperatura ambiente e geladeiras para armazenamento dos kits.

Citar a utilização de soros controles (nível normal –código ----- e patológico – código -----) nas análises realizadas juntamente com a frequência da utilização dos mesmos. Descrever o procedimento de verificação de novos lotes de controles e reagentes.

Citar POP para controle interno.

Controle Externo

Descrever os procedimentos utilizados nas avaliações de qualidade feitas por programas de comparação entre laboratórios ou outros controles de qualidade: PNCQ-SBAC e/ou PELM-SBPC

Gerenciamento dos dados obtidos no Controle Interno e Externo

Definir como os dados de controle são arquivados e gerenciados.

Fazer referência ao manual ou POP de garantia da qualidade.

VALORES DE REFERÊNCIA

Soro ou Plasma: Crianças: 3,0 a 7,0 mg/dL
Adultos: 2,5 a 5,0 mg/dL

Urina: 300 a 1000 mg/24 horas.

Fosfolípides (em lecitina): 125 a 250 mg/dL

SIGNIFICADO CLÍNICO

No organismo, além de seu papel na mineralização óssea, o fósforo na forma de fosfato, participa de uma variedade de funções estruturais e metabólicas. Por exemplo, os fosfolípides nas membranas celulares, o fosfato de alta energia na captura e transferência de energia, como segundo mensageiro no sistema endócrino (AMPc) e como eixo principal para RNA e DNA. Portanto, as anormalidades no metabolismo do fósforo podem originar inúmeros problemas.

Valores Elevados – Hiperfosfatemia: A concentração de fósforo no soro está aumentada na insuficiência renal (aguda e crônica), no hipoparatiroidismo, hipervitaminose D, acromegalia, rabdomiólise, e nas situações de lise tumoral aguda (por exemplo, quimioterapia do linfoma). A hiperfosfatemia pode ocorrer após a administração de laxativos e enemas de retenção contendo fosfato.

Valores Diminuídos – Hipofosfatemia: A concentração de fósforo está diminuída na fase de absorção dos carboidratos(glicose e demais açúcares são fosforilados ao penetrar nas células).

A hipofosfatemia típica ocorre no: hiperparatiroidismo, raquitismo (deficiência de Vitamina D), esteatorreia, e em algumas doenças com deficiente reabsorção tubular do fosfato (Síndrome de Fanconi).

A ingestão prolongada de antiácidos contendo hidróxido de alumínio e hidróxido de magnésio ocasiona uma diminuição do fósforo sérico pela precipitação de fosfatos insolúveis no trato gastrointestinal.

A hiperalimentação parenteral também diminui os níveis de fósforo sanguíneo devido a movimentação do fosfato do plasma para os músculos e tecido adiposo.

VALORES CRÍTICOS

Valor Baixo: < 1,0 mg/dL de Fósforo

Valor Alto: Nenhum

LINEARIDADE E LIMITE DE DETECÇÃO

Linearidade

A reação é linear até 9,0 mg/dL (2,9 mmol/L). Para valores maiores diluir a amostra com água destilada ou deionizada e repetir a determinação. Multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

Limite de Detecção

$L_D = 0,15 \text{ mg/dL}$

O intervalo de medida é de 0,15 mg/dL até 9,0 mg/dL.

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Os resultados deverão ser usados em conjunto com informações disponíveis da avaliação clínica e outros procedimentos diagnósticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baginski, E.S.: Clin. Chem. 13, 326, 1967.
2. Baginsk, ES. Am J Med Tech 1969;35:475.
3. Fiske CH, Subarrow Y.J Biol Chem 1925;66:375.
4. Gomori, G. J Lab Clin Med 1942;27:955.
5. Henry RJ, Cannon DC, Wikelman JW. Clinical Chemistry, Principles and Technics, 2a Ed. New York, Harper & Row, 1974.
6. Moura, R.A.A.: Técnicas de Laboratório, 2ª Ed. Atheneu.
7. Taylor, A.E.: J.Biol.Chem. 18, 215, 1914.
8. FÓSFORO , Instruções de Uso, Gold Analisa Diagnóstica.

APÊNDICE F: Gama-glutamyltransferase

GAMA GT - CAT. 361

Tampão: 1 x 48 mL

Substrato: 1 x 12 mL

Método: Cinético-Colorimétrico.

Finalidade: Dosagem da (?-Glutamyltransferase (Gama GT).

Amostra: Soro, Plasma.

Bireagente - Necessita preparar Reagente de Trabalho

Estabilidade do Reagente de Trabalho: 45 dias

Necessita equipamento com cubeta termostaticada.

Tempo de Reação: 5 minutos a 37° C.

Linearidade: 230 U/L.

GAMA GT

PRINCÍPIO DO TESTE

A gama-glutamyltransferase (gama-GT) catalisa a transferência do grupamento glutamyl da L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilida para a glicilglicina liberando L- γ -glutamylglicilglicina e 5-amino-2-nitro-benzoato.

A atividade catalítica da enzima é determinada no comprimento de onda de 405 nm.

APLICAÇÃO CLÍNICA

A determinação da GGT serve para diferenciar colestases mecânica e viral das induzidas por drogas. Nas duas primeiras, a GGT e ALP estão igualmente elevadas. Nas colestases induzidas por drogas os valores da GGT são muito mais altos.

Os níveis de GGT encontram-se altos em pacientes que fazem uso prolongado de drogas que induzem o sistema microsomal hepático como o fenobarbital, fenitoína, entre outras.

Valores elevados de GGT em pacientes anictéricos com câncer são um seguro indicador de metástases hepáticas.

A GGT é muito sensível na seleção de alcoólatras. No alcoolismo crônico, os níveis séricos da GGT diminuem com a retirada do álcool e se elevam com a exposição ao mesmo. Com base nesta observação, a dosagem da GGT é utilizada nos centros de tratamentos de alcoólatras para documentar o sucesso da terapia e identificar os pacientes que retomaram ao alcoolismo após a alta.

AMOSTRA

Preparo do Paciente

Colher sangue pela manhã após jejum de 8 horas, salvo orientações médicas.

Amostras utilizadas

Soro, plasma (EDTA).

Estabilidade e armazenamento da amostra

A enzima no soro ou plasma é estável por 5 dias entre 2-8°C.

Volume ideal utilizado para análise

(Definir o volume ideal a ser encaminhado para análise).

Volume mínimo utilizado para análise

(Definir o volume mínimo a ser encaminhado para análise).

Critérios para rejeição da amostra

Não usar amostras com sinais de contaminação bacteriana.

Evitar amostra com hemólise.

Plasmas citratados, fluoretados ou oxalatados produzem inibição da atividade da GGT.

Fazer referência ao manual ou POP de coleta, separação e distribuição de material.

REAGENTE UTILIZADO

GAMA GT

CAT. 361

MS 80022230153

GOLD ANALISA DIAGNÓSTICA LTDA

CNPJ – 03.142.794/0001-16

Av. Nossa Senhora de Fátima, 2363

Belo Horizonte – MG – Brasil

Farmacêutico Responsável: Homero Jackson de Jesus Lopes CRF – MG - 2010

Componentes do kit:

Conservar entre 2-8°C.

1- Tampão - Contém glicilglicina 150 mmol/L em tampão TRIS 100 mmol/L pH 8,25 e azida sódica 14,6 mmol/L. Tóxico.

2- Substrato - Contém L-gamaglutamil-3-carboxi-4-nitroanilida 20 mmol/L e azida sódica 14,6 mmol/L. Tóxico.

Preparo do Reagente de Trabalho

Misturar 1 mL do Substrato (2) com 4 mL do Tampão (1) e homogeneizar.
Estável por 6 semanas entre 2-8°C ou 5 dias na temperatura ambiente.

Estabilidade

Os reativos são estáveis até o vencimento da data de validade impressa no rótulo do produto e na caixa quando conservados bem vedados na temperatura recomendada. Evitar a contaminação durante o uso.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES ESPECIAIS;

- 1- O kit destina-se somente para uso diagnóstico *in vitro*.
- 2- Aplicar os cuidados habituais de segurança na manipulação dos reagentes e amostra biológica.
- 3- Recomendamos o uso das Boas Práticas em Laboratório Clínico para a execução do teste.
- 4- De acordo com as instruções de biossegurança, todas as amostras devem ser manuseadas como materiais potencialmente infectantes.
- 5- O Tampão (1) e o Substrato (2) contêm azida sódica como conservante. Evitar contato os olhos e mucosas. Não aspirar ou ingerir. Tóxico.
- 6- Descartar os reagentes e as amostras de acordo com as resoluções normativas locais, estaduais e federais de preservação do meio ambiente.
- 7- Recomendamos o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) como avental, óculos de segurança, luvas descartáveis e outros que se fizerem necessários para a realização do teste.
- 8- Não deve ser utilizada a boca para pipetagem de reagentes, amostra ou qualquer outra substância.
8. Em caso de acidentes tomarem as medidas cabíveis de primeiros socorros.
9. A observação rigorosa da temperatura, do tempo de incubação, da pipetagem, da estabilidade dos reagentes e da limpeza da vidraria é de extrema importância para se obter resultados exatos e precisos.

PROCEDIMENTO

Procedimento Técnico Manual

- Banho-Maria a 37°C
- Espectrofotômetro para leituras em 405 nm
- Pipetas automáticas
- Cronômetro

Procedimento Técnico Automatizado

Citar nome, modelo e o local onde se encontra o equipamento; Fazer referência ao manual ou POP para utilização do mesmo.

Procedimento Técnico Alternativo

Citar o equipamento alternativo e os procedimentos para medição dos ensaios. Indicar as possíveis diferenças quando os procedimentos manuais substituírem os procedimentos automatizados.

PROCEDIMENTO

Procedimento Manual

A- Condições de Reação

Equipamento: Espectrofotômetro

Leitura: Comprimento de onda 405 nm (400-420 nm).

Temperatura: 25° C, 30° C ou 37° C.

Medida: contra o ar (aumento de absorbância)

B- Técnica de Análise

1- Deixar o Reagente de Trabalho atingir a temperatura de trabalho (25°C, 30°C ou 37°C) antes da realização do teste.

2- Pipetar dentro da cubeta:

Reagente de Trabalho	1000 µL
Amostra	100 µL

3- Homogeneizar. Ler a absorbância inicial após 1 minuto e ao mesmo tempo acionar o cronômetro.

- 4- Ler a absorbância novamente após exatamente 1, 2 e 3 minutos.
 5- As diferenças entre absorbâncias ($\Delta A/\text{min}$) devem ser praticamente iguais, indicando a linearidade do método.

Procedimento em Analisadores Automáticos

Mencionar o manual ou POP para utilização do equipamento analítico. Anexar o guia de aplicação dos reagentes para o sistema automático.

CÁLCULOS:

Ver Linearidade.

Calcular a média das diferenças das absorbâncias por minuto ($\Delta A/\text{min}$).

Para calcular a atividade (U/L) de Gama GT multiplicar o $\Delta A/\text{min}$ médio pelo fator 1158 quando as leituras forem feitas em 405 nm.

Gama GT (U/L) nas temperaturas de 25°C, 30°C ou 37°C = $\Delta A/\text{min} \times 1158$

Cálculo do Fator:

V_t = volume total do ensaio = 1,1 mL

V_a = volume da amostra = 0,10 mL

1000 = conversão de U/mL para U/L
 cm)

d = espessura da cubeta, via da luz (1

ϵ = absortividade milimolar da p-nitroanilina = 9,5

Fator = $(V_t \times 1000) \div (\epsilon \times V_a \times d) = (1,1 \times 1000) \div (9,5 \times 0,1 \times 1) = 1158$

Exemplo: $A_0 = 0,208$

$A_1 = 0,222$

$A_2 = 0,237$

$A_3 = 0,252$

$A_1 - A_0 = 0,014$

$A_2 - A_1 = 0,015$

$A_3 - A_2 = 0,015$

$\Delta A/\text{min}$ médio = 0,015

Gama GT(U/L) = $\Delta A/\text{min} \times 1158 = 0,015 \times 1158 = 17 \text{ U/L}$.

RESULTADOS

Unidade de Medida: **U/L**

Fator de Conversão de Unidades (U/L para SI): $\mu\text{Kat/L} = \text{U/L de gama GT} \times 0,0167$

CONTROLE DA QUALIDADE

Materiais

Identificar os materiais de controle interno e externo da qualidade, citando fabricante e número de catálogo.

Referenciar POP para limpeza e secagem dos materiais utilizados.

Controle Interno

Descrever a calibração periódica de pipetas, equipamentos utilizados, controle de temperatura ambiente e geladeiras para armazenamento dos kits.

Citar a utilização de soros controles (nível normal –código ----- e patológico – código -----) nas análises realizadas juntamente com a frequência da utilização dos mesmos. Descrever o procedimento de verificação de novos lotes de controles e reagentes.

Citar POP para controle interno.

Controle Externo.

Descrever os procedimentos utilizados nas avaliações de qualidade feitas por programas de comparação entre laboratórios ou outros controles de qualidade: PNCQ-SBAC e/ou PELM-SBPC.

Gerenciamento dos dados obtidos no Controle Interno e Externo.

Definir como os dados de controle são arquivados e gerenciados.

Fazer referência ao manual ou POP de garantia da qualidade.

VALORES DE REFERÊNCIA (37°C)

Temperatura de Trabalho	25°C	30°C	37°C
Homens	6 - 28 U/L	8 - 46 U/L	11 - 61 U/L
Mulheres	4 - 18 U/L	7 - 29 U/L	9 - 39 U/L

SIGNIFICADO CLÍNICO

A GGT é uma enzima encontrada em concentração relativamente alta nos rins, pâncreas, fígado e próstata. É um sensível indicador de doenças inflamatórias e de lesão hepática, estando significamente elevada nas doenças obstrutivas hepatobiliares

A GGT tem maior especificidade que a fosfatase alcalina (ALP) e a TGO (AST) para avaliar doença hepática porque ela não se eleva na doença óssea como a ALP e nem nas doenças do músculo esquelético como a transaminase oxalacética (TGO). A determinação da GGT serve para diferenciar colestases mecânica e viral das induzidas por drogas. Nas duas primeiras, a GGT e ALP estão igualmente elevadas. Nas colestases induzidas por drogas os valores da GGT são muito mais altos. Os níveis de GGT encontram-se altos em pacientes que fazem uso prolongado de drogas que induzem o sistema microssomal hepático como o fenobarbital, fenitoína, entre outras.

Valores elevados de GGT em pacientes anictéricos com câncer são um seguro indicador de metástases hepáticas.

A GGT é muito sensível na seleção de alcoólatras. No alcoolismo crônico, os níveis séricos da GGT diminuem com a retirada do álcool e se elevam com a exposição ao mesmo. Com base nesta observação, a dosagem da GGT é utilizada nos centros de tratamentos de alcoólatras para documentar o sucesso da terapia e identificar os pacientes que retomaram ao alcoolismo após a alta.

VALORES CRÍTICOS

Não Aplicável.

LINEARIDADE E LIMITE DE DETECÇÃO:

Linearidade

A linearidade da reação é até 230 U/L ou até um ΔA /minuto de 0,200. Quando o ΔA /minuto for superior a 0,200 em Hg 405 nm, diluir 0,1 mL da amostra com 0,5 mL de solução de NaCl 150 mmol/L (0,85%) e repetir a dosagem. Multiplicar o resultado por 6.

Limite de detecção

$L_D = 3,0$ U/L. O intervalo de medida vai de 3,0 U/L até 230 U/L.

LIMITAÇÕES DO MÉTODO.

Os resultados deverão ser usados em conjunto com informações disponíveis da avaliação clínica e outros procedimentos diagnósticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Fundamento de Química Clínica, 4ª Ed - Guanabara Koogan SA; 1998.
2. Inmetro - Boas Práticas de Laboratório Clínico e Listas de Verificação para Avaliação, Qualimark Editora, Rio de Janeiro, 1997.

3. IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes-Part 4. IFCC Method for γ -Glutamyltransferase. J Clin Chem Clin Biochem 1983;21:633-45.
4. Internacional Federation of Clinical Chemistry, Expert Panel on Enzymes. Clin Chim Acta 1983, 135:315F.
5. Szasz, G.: Clin Chem 1969;15:124.
6. Szasz, G. METH. d. enz. Analyse. H. U. Bergmeyer, Verlag Chemie, Weinheim. 3rd ed. 757-762 (1974).
7. GAMA GT, Instruções de Uso, Gold Analisa Diagnóstica.

MAGNÉSIO-PP

CAT. 450M: Padrão: 1 x 5 mL

Reagente de Cor: 1 x 50 mL

CAT. 450: Padrão: 1 x 5 mL

Reagente de Cor: 2 x 50 mL

CAT. 450E: Padrão: 1 x 5 mL

Reagente de Cor: 4 x 50 mL

Método: Colorimétrico-Calmagita.

Finalidade: Dosagem do Magnésio.

Amostra: Soro, Plasma.

Monoreagente - Líquido Pronto para Uso.

Estabilidade do Reagente: Até a data de validade do kit.

Tempo de Reação: 2 minutos à temperatura ambiente.

Linearidade: 4,0 mg/dL.

MAGNÉSIO-PP**PRINCÍPIO DO TESTE**

Em pH alcalino, o magnésio reage com a calmagita formando um complexo colorido, cuja absorvância medida em 520 nm, é proporcional à concentração de magnésio na amostra analisada.

A presença de EGTA (ácido tetracético etilenoglicol) no reagente evita a interferência do cálcio.

APLICAÇÃO CLÍNICA

A dosagem do Magnésio no sangue é empregada para avaliar doenças neuromusculares, tremores (alcoolismo), tetania e convulsões. É muito empregada também em neonatologia, estados de mal nutrição e mal absorção intestinal.

AMOSTRA**Preparo do Paciente**

Colher sangue pela manhã após jejum de 8 horas, salvo orientações médicas.

Amostras utilizadas

Soro, plasma (heparinizado) ou urina de 24 horas.

O líquido deve ser centrifugado.

Estabilidade e armazenamento da amostra

O analito é estável por 10 dias entre 2-8°C.

Volume ideal utilizado para análise

(Definir o volume ideal a ser encaminhado para análise).

Volume mínimo utilizado para análise

(Definir o volume mínimo a ser encaminhado para análise).

Crítérios para rejeição da amostra

Não utilizar amostras hemolisadas.

Plasmas citratados, oxalatados, fluoretados ou com EDTA, interferem no resultado, fornecendo resultados falsamente diminuídos.

Fazer referência ao manual ou POP de coleta, separação e distribuição de material.

REAGENTE UTILIZADO

MAGNÉSIO-PP

CAT. 450

MS 80022230082

GOLD ANALISA DIAGNÓSTICA LTDA
CNPJ – 03.142.794/0001-16

Av. Nossa Senhora de Fátima, 2363
Belo Horizonte – MG – Brasil

Farmacêutico Responsável: Homero Jackson de Jesus Lopes CRF – MG - 2010

Componentes do kit:

Conservar entre 2-8°C

1- Padrão – Contém magnésio 2 mg/dL.

2- Reagente de Cor - Contém calmagita 80 mmol/L, EGTA (ácido tetracético etilenoglicol) 60 mmol/L e dietilamina 200 mmol/L.

Cuidados e Precauções Especiais:

- 1- O kit destina-se somente para uso diagnóstico *in vitro*.
- 2- Aplicar os cuidados habituais de segurança na manipulação dos reagentes e amostra biológica. Fazer referência ao manual ou POP de segurança.
- 3- Os reagentes utilizados em condições técnicas adequadas e armazenados nas condições especificadas são estáveis até a validade citada na embalagem.
- 4- O reagente uma vez usado contém soro, plasma ou urina, eventualmente infectado, e deve ser tratado como material potencialmente infeccioso. Fazer o descarte em lugar apropriado.
- 5- O Reagente de Cor é tóxico. Nunca pipetar com a boca. Em caso de vazamento acidental, lavar o local com bastante água corrente.
- 6- Recomenda-se o uso de luvas descartáveis durante o manuseio das substâncias. Em caso de contato com os olhos ou pele, lavar abundantemente com água corrente. Em caso de ingestão, procurar atendimento médico.

EQUIPAMENTOS

Procedimento Técnico Manual

- Espectrofotômetro ou fotômetro para leituras em 520 nm.
- Pipetas automáticas.
- Cronômetro.
- Temperatura: ambiente (15-30°C).

Procedimento Técnico Automatizado

Citar nome, modelo e o local onde se encontra o equipamento; Fazer referência ao manual ou POP para utilização do mesmo.

Procedimento Técnico Alternativo

Citar o equipamento alternativo e os procedimentos para medição dos ensaios. Indicar as possíveis diferenças quando os procedimentos manuais substituírem os procedimentos automatizados.

PROCEDIMENTO

Observações:

O material usado no procedimento deve estar completamente isento de magnésio. É aconselhável utilizar material descartável ou lavado com ácido nítrico a 50 % (v/v) ou ácido clorídrico 50% (V/V). Na lavagem do material, utilizar bastante corrente e enxaguar com água deionizada ou destilada, para evitar a obtenção de resultados incorretos devido à contaminação com traços de magnésio.

Para dosagem na urina, homogeneizar a amostra, separar 5,0 ml, acertar o pH entre 3 e 4 utilizando HCL concentrado e aquecer a 56° C 15 minutos. Diluir a urina 1:5 (1,0 ml de urina + 4,0 ml de água destilada ou deionizada). Multiplicar o resultado obtido por 5.

Procedimento Manual:

Deixar os reagentes atingirem a temperatura ambiente antes da realização do teste.

1- Identificar 3 tubos de ensaio com "Branco", "Teste" e "Padrão" e pipetar:

Tubos	Branco	Teste	Padrão
Amostra	—	10 µL	—
Padrão	—	—	10 µL
Reagente de Cor	1000µL	1000µL	1000µL

1- Agitar bem e deixar durante 2 minutos à temperatura ambiente.

2- Ler a absorbância (A) do Padrão (Ap) e do Teste (At), zerando o aparelho com o Branco em 520 nm.

3- A cor é estável durante 1 hora.

Procedimento em Analisadores Automáticos:

Mencionar o manual ou POP para utilização do equipamento analítico. Anexar o guia de aplicação dos reagentes para o sistema automático.

CÁLCULOS

Ver Linearidade.

Como a metodologia obedece à lei de Lambert-Beer, a concentração do teste pode também ser calculada através do Fator de Calibração (FC).

Concentração do Padrão = C_p

Concentração do Teste = C_t

Absorbância do Padrão = A_p

Absorbância do Teste = A_t

$$C_t \text{ (mg/dL)} = \frac{A_t \times C_p}{A_p}$$

Exemplo: $C_p = 2,0 \text{ mg/dL}$ $A_p = 0,252$ $A_t = 0,276$

$$F_c = \frac{C_p}{A_p} = \frac{2,0}{0,252} = 7,94$$

$$C_t = F_c \times A_t = 7,94 \times 0,276 = 2,2 \text{ mg/dL}$$

Dosagem na Urina (mg/24 horas):

$$\text{mg/24 horas} = \frac{\text{Magnésio (mg/dL)} \times \text{Volume Urinário de 24 h em mL}}{100}$$

RESULTADOS

Unidade de Medida:

mg/dL

Fator de Conversão de Unidades (mg/dL para SI):

mg/dL de Magnésio $\times 0,41 = \text{mmol/L de Magnésio.}$

CONTROLE DA QUALIDADE

Materiais:

Identificar os materiais de controle interno e externo da qualidade, citando fabricante e número de catálogo.

Referenciar POP para limpeza e secagem dos materiais utilizados.

Controle Interno:

Descrever a calibração periódica de pipetas, equipamentos utilizados, controle de temperatura ambiente e geladeiras para armazenamento dos kits.

Citar a utilização de soros controles (nível normal –código ----- e patológico – código -----) nas análises realizadas juntamente com a frequência da utilização dos mesmos. Descrever o procedimento de verificação de novos lotes de controles e reagentes.

Citar POP para controle interno.

Controle Externo:

Descrever os procedimentos utilizados nas avaliações de qualidade feitas por programas de comparação entre laboratórios ou outros controles de qualidade: PNCQ-SBAC e/ou PELM-SBPC.

Gerenciamento dos dados obtidos no Controle Interno e Externo:

Definir como os dados de controle são arquivados e gerenciados.

Fazer referência ao manual ou POP de garantia da qualidade.

VALORES DE REFERÊNCIA:

- **Soro ou plasma:** 1,8 a 2,1 mg/dL = 0,74 a 0,87 mmol/L.
- **Líquor:** 2,5 a 3,5 mg/dL
- **Urina:** 48 a 152 mg/24 horas (variável com a alimentação).

SIGNIFICADO CLÍNICO:

A determinação do magnésio tem grande importância clínica principalmente na área da neonatologia, onde os distúrbios metabólicos deste íon (hipomagnesemia) são os responsáveis por sinais e sintomas clínicos, freqüentemente atribuídos ao cálcio (hipocalcemia).

Valores diminuídos do magnésio sérico ocorrem em várias condições clínicas: estado de mal nutrição como Kwashiorkor, alcoolismo (principalmente no “delirium tremens”), estado de mal absorção (esteatorréia), pancreatite aguda, hipoparatiroidismo, hipertireoidismo e hiperaldosteronismo.

Na acidose diabética, o magnésio sérico modifica-se paralelamente ao potássio, antes e após insulino-terapia e hidratação.

Elevação do magnésio é encontrada na uremia e no nanismo hipofisário tratado com hormônio do crescimento.

VALORES CRÍTICOS:

Soro: > 4,6 mg/dL
< 1,2 mg/dL

Incluir o procedimento a ser adotado diante de um resultado crítico.

LINEARIDADE E LIMITE DE DETECÇÃO:

Linearidade:

A reação é linear até 4,0 mg/dL (1,64 mmol/L). Para valores maiores diluir a amostra com água destilada ou deionizada e realizar a determinação. Multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição empregado.

Limite de detecção:

O Limite de detecção do kit foi verificado no comprimento de onda de 520 nm, sendo que a alteração mínima detectável foi de 0,02 mg/dL. O intervalo de medida vai de 0,02 mg/dL até 4,00 mg/dL.

LIMITAÇÕES DO MÉTODO:

Os resultados deverão ser usados em conjunto com informações disponíveis da avaliação clínica e outros procedimentos diagnósticos.

Interferências:

Plasmas citratados, oxalatados, fluoretados ou com EDTA, interferem no resultado, fornecendo resultados falsamente diminuídos.

Não utilizar amostras hemolisadas.

O líquido deve ser centrifugado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1- Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Fundamento de Química Clínica, 4ª Ed - Editora Guanabara Koogan SA; 1998.
- 2- Chauman UPS, Ray Sarkar BC. Anal Biochem 1969; 32:70.
- 3- Gindler EM, Heth DA. Clin Chem 1971; 17:662.
- 4- Nogueira DM. Strufaldi B. Hirata MH. et al. Métodos de Bioquímica Clínica: Técnica e Interpretação , São Paulo, Pancast Editora, 1990:229-230.
- 5- MAGNÉSIO-PP, Instruções de Uso, Gold Analisa Diagnóstica.

ANEXO A- Tradução da bula da β -endorfina

Beta Endorfina (nome do uso). A β -endorfina HOPE MICROWELL ELISA.

Catalogo N° OP-501 é de uso na medição quantitativa de β -endorfina.

PRINCÍPIOS DO TESTE

A β -endorfina da HOPE MICROWELL ELISA é um competitivo agrupado reagente ELISA. Os microwells são cobertos com um segundo anticorpo cabra /coelho IgG. Uma certa quantia de anti β -endorfina de coelho (Solução Anticorpos) é acrescentado para incubar com o padrão ou espécies. Então uma β -Endorfina - HRP enzima conjugada é acrescentada para competir com a β -endorfina na solução para prender a sítios limitados de ligação no primário anti β -Endorfina anticorpos de coelho na fase sólida. Depois de lavar, com substrato (solução A) e chromogen (solução B) são acrescentados para desenvolver uma cor. A reação da enzima é suspensa com a adição de ácido. A intensidade da cor que é proporcional à enzima conjugada é inversamente proporcional à concentração de β -endorfina em espécies e parâmetros. A concentração da β -endorfina de modelo corre constantemente com parâmetros pode ser determinado a partir da curva standard.

MATERIAIS FORNECIDOS

- Tiras Microwell: microwells revestidos com IgG de cabra e anti-coelho (12 tiras x 8 wells)
- Solução A: Substrato de Enzima, H₂O₂, 1 frasco (7 ml)
- Solução B: Cromogênio, Tetrametilbenzidine, 1 frasco (7ml)
- Solução de reserva de enzima conjugado (50x): conjugado com β -endorfina. 1 frasco (150 ml)
- Solução Anticorpos: Anti- β -endorfina de coelho anticorpo 1 frasco (7 ml)
- Suprimento de Solução básica: β -endorfina 16 ng/ml 1 frasco (2 ml)
- Amostra de diluente: 0.02 tampão de fosfato pH 7.6 contém 0.15 M NaCl, 0.01 m EDTA, 0.5% BSA, e 0.02% Triton X-100. 1 frasco (12 ml)
- Concentrado de limpeza (10x): 1 frasco (50 ml)
- Diluente Conjugado: 1 frasco (7 ml)
- Solução paralisante: 2N HCl 1 frasco (12 ml)

ARMAZENAGEM E ESTABILIDADE

- Guarde o Kit a uma temperatura entre 2 a 8° C.
- Mantenha os microwells selados em um ambiente seco com dessecantes.

- Os reagentes são estáveis até a expiração do kit.
- Não exponha os reagentes de teste ao calor, sol ou luz forte durante o armazenamento ou durante o uso.

PREPARAÇÃO PARA O ENSAIO

- Traga todos os reagentes e espécies para a sala com temperatura de 20 a 25°C e gire vagarosamente para obter uma mistura completa.
- Preparação do tampão de limpeza: Dilua o concentrado de limpeza (10x) com água deionizada para um volume final de 500 ml.
- Preparação do conjunto standard: Dilua suprimento básico 16 ng/ml para uma série de concentrações desejáveis de β -endorfina com diluente da amostra.
- Preparação da Solução de trabalho conjugado: Dilua 20 ml de Solução de reserva conjugada em 1 ml de diluente conjugado. Isto é suficiente para duas tiras de wells.

PROCEDENDO AO ENSAIO

- Coloque o número desejado de wells cobertos no recipiente.
 - Coloque 25 ml de standards ou espécies em cada well.
 - Acrescente 50 ml de solução anticorpos em cada well e misture levemente de 5 a 10 vezes para garantir uma completa mistura. Continue a incubar por 30 minutos à temperatura ambiente.
- NÃO LAVE entre o passo 3 e o passo 4.
- Acrescente 50 ml de β -endorfina HRP enzima conjugada a cada well, misture levemente de 5 a 10 vezes continue a incubar por 60 minutos à temperatura ambiente.
 - Lave cada well 5 vezes com a solução de limpeza 1x. Certifique-se de que nenhuma gotícula de água permanece dentro de cada well.
 - Despeje 50 ml da solução A e 50 ml da solução B em cada well e deixe incubar por 30 minutos.
 - Pare a reação com 100 ml de Solução paralisante. <forte>
 - Leia O. D. a 450 nm com um leitor microwell.
 - É importante lavar os microwells completamente e remover as últimas gotículas com tampão diluente para alcançar os melhores resultados.
 - A absorção é uma função de tempo e temperatura das incubações. É recomendado ter todos os reagentes e amostras utilizados e todos os wells necessários indicados e guardados no recipiente, isto vai garantir igualdade de tempo para cada uso da pipeta sem interrupção.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

- Construa uma curva delineando OD 450 nm sobre eixo-y contra a concentração standard de β -endorfina ng/ml no eixo-x. Trace uma linha curva regular através dos pontos rejeitando principalmente os pontos aberrantes.
- Use os valores de absorvência obtidos por espécime para interpolar suas concentrações de β -endorfina da resultante curva standard.
- Um exemplo de uma operação típica:

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

- Extensão dinâmica da sensibilidade: 0.20 – 20 ng/ml.
- Especificidade durante a reação baseada em teste de rádio imunização.

ANEXO B - Tabelas de Ca, P e Mg.

Tabela 1. Concentração sérica em mg/dL de cálcio, média e desvio padrão, em vacas leiteiras na fase de periparto, gestantes, grupo (G1) e de vacas leiteiras não-gestantes, grupo (G2).

Ca – mg/dL	Vacas G1 – mg/dL					Vacas G2 – mg/dL (controle)	
	14° dia pré-parto	7° dia pré- parto	Dia do parto	7° dia pós-parto	14° dia pós-parto	1° colheita	2° colheita
009	10,29	10,93	3,52	9,28	10,52	10,59	10,14
062	10,32	10,23	8,07	8,81	9,03	9,99	9,80
083	9,20	9,26	5,01	8,22	8,05	9,25	9,82
106	8,75	9,73	8,16	8,45	7,75	9,53	9,68
117	9,80	10,34	7,87	8,68	8,67	9,66	8,68
126	10,56	9,45	7,54	8,97	8,81	8,98	8,42
129	9,11	9,86	8,42	9,54	9,44	9,10	8,65
172	8,47	8,56	8,01	8,64	8,43	9,74	8,75
191	9,79	8,72	5,84	7,80	10,03	9,20	8,91
192	9,90	9,48	5,50	6,69	9,4	10,52	11,90

Valores de referencia Ca: 8,5 – 10, 5 mg/dL.

Tabela 2. Concentração sérica em mg/dL de fósforo, média e desvio padrão, em vacas leiteiras na fase de periparto, gestantes grupo (G1) e de vacas leiteiras não-gestantes do grupo (G2).

P – mg/dL	Vacas – mg/dL -G1					Vacas G2 – mg/dL (controle)	
	-14 dia pré- parto	-7 dia pré- parto	0 dia do parto	+7 dia pós- parto	+14 dia pós- parto	1 ^o colheita	2 ^o colheita
009	7,50	7,60	2,70	6,90	7,00	9,00	9,80
062	10,40	6,70	5,90	5,10	7,80	9,00	9,30
083	6,10	6,40	3,10	9,40	7,00	12,20	11,60
106	7,50	6,60	9,30	5,90	11,90	10,00	11,60
117	10,50	7,20	7,50	9,40	9,00	9,50	12,10
126	10,00	7,20	4,90	6,40	8,40	12,20	10,70
129	7,90	9,40	5,70	7,90	8,00	11,00	9,00
Tila 172	8,20	7,90	6,70	10,70	10,40	8,90	9,00
191	8,90	5,80	4,90	6,50	7,10	10,70	12,60
192	6,80	10,20	10,80	10,50	12,10	11,20	10,00

Valores de referencia P: 5,65 – 6,65 mg/dL.

Tabela 3. Concentração sérica em mg/dL de magnésio, média e desvio padrão, em vacas leiteiras no periparto, gestantes grupo (G1) e de vacas leiteiras não-gestantes (G2).

Mg – mg/dL	Vacas G1					Vacas G2 (controle)	
	Período	-14 dia pré- parto	-7 dia pré-parto	0 dia do parto	+7 dia pós- parto	+14 dia pós- parto	1 ^o colheita
009	2,26	2,38	3,41	2,49	3,55	2,32	2,52
062	2,06	2,13	2,09	2,29	2,31	2,55	2,22
083	2,53	3,49	3,38	2,49	2,78	2,04	2,11
106	2,50	3,20	2,28	2,06	2,57	2,55	2,48
117	5,73	2,88	3,17	2,80	3,00	2,22	2,29
126	2,61	3,43	3,98	3,14	3,58	2,26	2,22
129	3,15	2,71	2,65	3,02	3,23	2,46	2,45
172	2,62	2,26	2,51	2,33	2,24	2,12	2,19
191	2,64	2,72	3,35	2,37	2,21	2,49	2,18
192	2,26	2,98	2,80	3,05	2,33	1,78	2,09

Valores de referencia: 1,8 – 2,4 mg/dL.

ANEXO C - Tabelas de FA, GGT e AST.**Tabela 1.** Concentração sérica em U/L da (FA) em vacas leiteiras gestantes na fase de parto (G1) e de vacas leiteiras não-gestantes (G2).

FA U/L	-14 G1	-7 G1	0 G1	+7 G1	+14 G1	Testemu.1º amostra G2	Testemu.2º amostra G2
009	83.00	45.43	34.58	83.63	110.00	401,64	174,49
062	225.08	195.65	28.91	25.81	71.75	282,90	217,34
083	39.75	34.07	51.10	87.24	16.52	256.57	209,08
106	83.00	22.71	73.30	63.80	120.28	235,41	230,24
117	29.00	73.82	75.88	310.26	36.00	275,16	143.00
126	66.08	38.00	186.00	62.98	88.00	172,42	200.30
129	101.00	71.24	95.50	32.52	65.04	129,06	217,85
172	498.18	460.49	393.89	337.62	426.42	109,44	212,17
191	212.69	75.37	168.81	25.29	73.30	66.08	168.81
192	85.18	191.52	146.09	87.76	92.40	24,26	34,00

Valores de referencia da FA: 37 – 196 U/L.

Tabela 2. Concentração sérica em U/L de gama-glutamiltransferase (GGT) em vacas leiteiras gestantes na fase de periparto grupo (G1) e de vacas leiteiras não-gestantes grupo (G2).

GGT U/L	-14 G1	-7 G1	0 G1	+7 G1	+14 G1	Testemu.1º amostra G2	Testemu.2º amostra G2
009	68,79	35,63	191,54	23,26	80,18	47,02	40,09
062	447,44	62,36	29,69	189,56	48,01	41,08	64,83
083	28,21	19,79	16,82	68,00	24,74	62,85	83,15
106	18,31	221,24	145,02	28,21	30,19	31,18	378,14
117	92,06	136,11	17,32	27,22	406,00	16,33	9,99
126	106,41	153,43	18,31	42,07	81,66	28,70	13,36
129	36,13	170,76	16,33	226,69	103,00	184,12	222,23
172	14,35	69,29	47,02	53,45	28,21	203,92	96,51
191	35,14	108,39	44,05	10,39	408,83	291,03	33,65
192	36,13	12,86	53,95	25,24	75,23	59,88	46,00

Valores de referenciada GGT: 11 – 31 U/L.

Tabela 3. Concentração sérica em U/L da (AST), em vacas leiteiras gestantes na fase de periparto (G1) e de vacas leiteiras não-gestantes (G2).

AST U/L	-14 G1	-7 G1	0 G1	+7 G1	+14 G1	Testemu.1º amostra G2	Testemu.2º amostra G2
009	101,35	90,23	81,58	138,44	138,85	117,01	100,53
062	89,41	103,83	91,47	128,14	104,24	86,91	115,36
083	163,98	96,41	44,49	268,23	84,46	91,05	123,19
106	92,29	49,44	99,71	117,84	100,53	149,56	65,10
117	74,16	32,13	35,43	5,35	35,02	91,47	67,98
126	3,29	138,44	65,92	250,10	227,85	145,85	68,80
129	49,03	122,78	36,67	86,93	154,09	111,66	140,50
172	92,70	164,81	107,53	82,40	154,92	117,01	73,34
191	68,80	28,43	184,17	130,61	131,43	116,60	103,41
192	63,04	23,48	104,24	133,90	398,43	64,68	148,00

Valores de referencia da AST: 39 – 150 U/L.

ANEXO D - Tabela da β -ENDORFINA.**Tabela 1.** Concentração sérica da β -endorfina (mg/dL) média, em vacas leiteiras na fase de periparto (G1) vacas gestantes e de vacas leiteiras não gestantes (G2).

β - Endorfina	Vacas G1					Vacas G2 (controle)	
	Períodos	-14 dia pré- parto	-7 dia pré- parto	0 dia do parto	+7 dia pós- parto	+14 dia pós- parto	1° colheita
009	203,60	330,00	595,20	658,40	435,20	290,4	396,4
062	323,60	144,80	426,00	208,00	234,80	338,0	366,8
083	179,20	403,20	210,40	183,20	369,20	361,6	376,4
106	392,80	401,60	449,20	426,40	470,40	307,6	360,0
117	216,00	351,20	378,40	390,00	352,80	292,8	271,6
126	335,60	272,40	361,20	270,80	257,20	386,0	280,8
129	271,20	353,20	265,60	256,40	280,00	328,8	251,6
172	467,20	420,80	165,60	408,00	395,60	305,2	280,8
191	459,20	354,80	384,80	403,60	317,60	326,4	280,4
192	259,20	368,40	216,00	292,80	228,80	264,0	256,4

Valor referencia do grupo G2: 312,12 – 320,08 mg/dL.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)