

CARLOS ANTÔNIO CARDOSO

**COMPARAÇÃO DE KITS COMERCIAIS NA DOSAGEM DE
CONSTITUINTES BIOQUÍMICOS DO SANGUE EM EQÜINOS HÍGIDOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, para obtenção
do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

CARLOS ANTÔNIO CARDOSO

**COMPARAÇÃO DE KITS COMERCIAIS NA DOSAGEM DE
CONSTITUINTES BIOQUÍMICOS DO SANGUE EM EQUINOS HÍGIDOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, para obtenção
do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 17 de janeiro de 2008.

Prof. Aloísio da Silva Pinto
(Co-orientador)

Prof^a. Tânia Toledo de Oliveira
(Co-orientadora)

Prof. José Camisão de Souza

Prof. José Domingos Guimarães

Prof. José Dantas Ribeiro Filho
(Orientador)

Agradeço a Deus por me fazer lutar.

*À Monica.
Aos meus filhos Bernardo, Carolina,
Luciana e Diogo.
Aos meus pais Jair e Helena.
Aos meus irmãos Geraldo, Lídia e Myriam.
Aos meus sobrinhos Fernanda, Gabriela,
Flávia, Marina, Rafael, Alexandre e Victor.
Aos meus cunhados Marília, Luiz, Waelcio
Patricia.*

AGRADECIMENTOS

Ao grande amigo, professor e orientador, José Dantas pela paciência, compreensão, amizade e principalmente pelos conhecimentos transmitidos.

Aos professores e amigos Ronei, Aloísio, Luiz Fernando, José Domingos e Tânia pela ajuda na superação desta árdua tarefa.

À Universidade Federal de Viçosa e a todos os seus funcionários.

Aos colegas Cláudio Nina, Telma, Davilson, Guará e Waleska pela ajuda.

Aos amigos José Geraldo, Adão, Cássio e Cida, sem os quais, este trabalho não poderia ser realizado.

Ao incansável amigo Hélcio.

Aos amigos da Scanlab Antonio, Leandro Correia, Leandro Ribeiro, Ludmila, Poliane, Geraldo, Mayra e Rodrigo pela força.

À Rosi pela grande ajuda.

Aos funcionários do Biofármacos, LAPAC e DVT pela valiosa contribuição.

Ao Haras onde foi realizado este experimento.

Aos amigos Marcos, Baltazar e Evandro pela ajuda inestimável com os kits da Bioclin

A todo o pessoal do DVT pela amizade e compreensão.

À In vitro Diagnóstica, Gilles, Celinho e todos os amigos, pelos kits para a realização do trabalho e pelo incentivo.

À Katal Diagnóstica pelos kits para a realização do trabalho.

À Bioclin Diagnóstica pelos kits para a realização do trabalho.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigado a todos.

BIOGRAFIA

CARLOS ANTONIO CARDOSO, brasileiro, nascido em Belo Horizonte, dia 07 de janeiro de 1953, filho de Jair Cardoso e Helena Ferreira Cardoso.

Cursou Ciências Biológicas na Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Campus de Belo Horizonte de 1976 à 1979. Cursou Medicina Veterinária na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais no período de 1979 à 1983.

No período de 1988 a 1990 cursou na UFV, no Departamento de Química, disciplinas para especialização em Agroquímica e de 2005 à 2008, cursou o Programa de Pós-Graduação, ao nível de Mestrado, subárea de Clínica de Grandes animais no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa , Minas Gerais.

Trabalhando há mais de vinte (20) anos como Assessor científico e diretor técnico em empresas no mercado diagnóstico: Merck – Quimitra, R.A. diagnóstica Ltda., Biolab Diagnóstica Ltda., In Vitro diagnóstica Ltda., Bio Import diagnóstica Ltda., Imunotec Ltda., Scanlab Diagnóstica Ltda.

Diretor técnico da empresa Scanlab Diagnóstica Ltda, de 2003 até a presente data.

SUMÁRIO

LISTA DAS TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Líquidos corporais	4
2.1.1. Plasma	5
2.1.2. Soro	5
2.2. Proteínas	6
2.2.1. Importância clínica	6
2.2.2. Proteínas plasmáticas totais (PPT)	7
2.2.2.1. Conceito e importância clínica	7
2.2.2.2. Descrição do método do biureto dosagem de proteínas totais ...	8
2.2.2.3. Metabolismo de proteínas totais e albumina	9
2.3. Albumina	10
2.3.1. Conceito e importância clínica	10
2.3.2. Descrição do método para a dosagem de albumina	11
2.4. Proteínas marcadoras de fase aguda	12
2.4.1. Resposta de fase aguda (RFA)	12
2.4.1.1. Conceito e importância clínica	12
2.4.2. Proteínas de fase aguda (Proteína C-reativa)	14
2.4.2.1. Conceito e importância clínica	14
2.4.2.2. Descrição dos métodos para a dosagem de Proteína c reativa	17
2.4.2.2.1. Descrição do método nefelométrico	17
2.4.2.2.2. Descrição do método turbidimétrico	18
2.4.2.2.3. Descrição do método aglutinação em látex	18
2.5. Eletrólitos	18
2.5.1. Conceito e importância clínica	18
2.5.1.1. Sódio (Na⁺)	20
2.5.1.1.1. Conceito e importância clínica	20
2.5.1.1.2. Descrição dos métodos para a determinação de sódio	21
2.5.1.1.3. Metabolismo de sódio	22

2.5.1.2. Potássio (K^+)	22
2.5.1.2.1. Conceito e importância clínica	22
2.5.1.2.2. Descrição dos métodos para dosagem de potássio (K^+).....	23
2.5.1.2.3. Metabolismo de potássio	24
2.5.1.3. Cloreto (Cl^-)	24
2.5.1.3.1. Conceito e importância clínica	24
2.5.1.3.1. Descrição dos métodos para a determinação cloretos (Cl^-)	25
2.5.1.3.3. Metabolismo de cloretos	26
2.5.1.4. Cálcio (Ca^{+2})	26
2.5.1.4.1. Conceito e importância clínica	26
2.5.1.4.2. Cálcio total (tCa) e cálcio ionizado (Ca^{2+}).....	27
2.5.1.4.3. Descrição dos métodos para a dosagem de Cálcio total (tCa)	28
2.5.1.4.4. Metabolismo de cálcio.....	28
2.5.1.5. Magnésio (Mg^{2+})	30
2.5.1.5.1. Conceito e importância clínica	30
2.5.1.5.2. Descrição dos métodos para a determinação de magnésio	31
2.5.1.5.3. Metabolismo de magnésio	31
2.6. Carboidratos	32
2.6.1. Glicose	32
2.6.1.1. Conceitos, importância clínica e metabolismo.....	32
2.6.1.2. Descrição dos métodos para a determinação de glicose	34
2.7. Bilirrubina	34
2.7.1. Conceito e importância clínica	34
2.7.1.1 Bilirrubina total.....	35
2.7.1.1.1. Conceito e importância Clínica.....	35
2.7.1.1.2. Descrição dos métodos para a bilirrubina total.....	36
2.7.2. Metabolismo de bilirrubina.....	36
2.8. Substâncias nitrogenadas.....	38
2.8.1. Uréia	38
2.8.1.1. Conceito e importância clínica.....	38
2.8.1.2. Descrição do método para a determinação de uréia - Cinética.....	39
2.8.1.3. Metabolismo de ureia	39
2.8.2. Creatinina.....	40
2.8.2.1. Conceito e importância clínica.....	40
2.8.2.2. Descrição do método para a determinação de creatinina	41

2.8.2.3. Metabolismo de creatinina.....	41
2.9. Enzimas.....	41
2.9.1. Fosfatase alcalina (AFL).....	45
2.9.1.1. Conceito e importância clínica.....	45
2.9.1.2. Descrição das técnicas para a fosfatase alcalina.....	46
2.9.1.2.1. Descrição da técnica cinética IFCC.....	46
2.9.1.2.2. Descrição da técnica cinética DGKC.....	46
2.9.1.2.3. Descrição da técnica cinética IFCC.....	47
2.9.1.3. Metabolismo de fosfatase alcalina.....	47
2.9.2. Y- glutamiltransferase (GGT).....	47
2.9.2.1. Conceito e importância clínica.....	47
2.9.2.2. Descrição das técnicas para Y- glutamiltransferase.....	48
2.9.2.2.1. Descrição da técnica cinética – Szasz modificado.....	48
2.9.2.2.2. Descrição da técnica cinética de γ-glutamiltransferase.....	48
2.9.2.2.3. Descrição da técnica cinética de γ-glutamiltransferase.....	48
2.9.2.3. Metabolismo de gamma glutamiltransferase.....	49
2.9.3. Aspartato aminotransferase (AST).....	49
2.9.3.1. conceito e importância clínica.....	49
2.9.3.2. Descrição das técnicas para aspartato aminotransferase.....	50
2.9.3.3. Metabolismo de aspartato aminotransferase.....	50
2.9.4. Creatino fosfocinase – CK.....	51
2.9.4.1. Conceito e importância clínica.....	51
2.9.4.2. Descrição das técnicas para creatina fosfocinase (CK).....	53
2.9.4.3. Metabolismo de creatina fosfocinase.....	53
3. OBJETIVOS.....	54
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
4.1. Animais.....	54
4.2. Manejo alimentar.....	54
4.3. Exame físico.....	55
4.5. Colheita das amostras.....	55
4.6. Análises laboratoriais.....	56
4.7. Distribuição dos grupos experimentais.....	56
4.8. Dosagens de parâmetros.....	57
4.8.1. Desenvolvimento das técnicas metodologias.....	58
4.8.1.1. Técnica de ponto final.....	58
4.8.1.2. Desenvolvimento das técnicas cinéticas.....	59

4.8.1.3. Técnica titulométrica do cloreto (Cl ⁻)	60
4.8.1.4. Métodos da fotometria de chama e do íon eletrodo seletivo	60
4.9. Análise dos dados	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1. Proteínas totais	61
5.2. Proteína c reativa (PCR).....	63
5.3. Fosfatase alcalina (AFL).....	64
5.4. Y-glutamilttransferase (GGT).....	65
5.5. Creatino fosfocinase	67
5.6. Cloretos (Cl ⁻).....	68
5.7. Cálcio total (iCa)	69
5.8. Albumina (g/dL), ureia (mg/dL), creatinina (mg/dL), glicose (mg/dL), aspartato aminotransferase (AST), Bilirrubina total (BT), Magnésio (Mg ⁺⁺ , sódio (Na ⁺) e Potássio (K ⁺).....	70
6. CONCLUSÕES.....	72
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
APÊNDICE A.....	84
Tabela 16 – Métodos analíticos utilizados nas análises dos constituintes sangüíneos	84
APÊNDICE B.....	86
Tabela 17 – Valores de referência dos constituintes sangüíneos de Proteínas totais (PPT) (g/dL) de outros autores.....	86
Tabela 18 – Valores de referência dos constituintes sangüíneos de albumina (ALB) (g/dL) de outros autores	87
Tabela 19 – Valores de referência dos constituintes sangüíneos de Ureía (UR) (mg/dL) de outros autores.....	88
Tabela 20 – Valores de referência dos constituintes sangüíneos de creatinina (CREAT) (mg/dL) de outros autores.....	89
Tabela 21 – Valores de referência dos constituintes sangüíneos de Bilirrubina total (BT) (mg/dL) de outros autores.....	90
Tabela 22 – Valores de referência dos constituintes sangüíneos de glicose (GLI) (mg/dL) de outros autores.....	91
Tabela 23 – Valores de referência dos constituintes sangüíneos de Sódio (Na ⁺) de outros autores	92
Tabela 24 – Valores de referência dos constituintes sangüíneos de potássio (K ⁺) (mEq/L) de outros autores	93

Tabela 25 – Valores de referência dos constituintes sangüíneos de cloretos (Cl ⁻) (mEq/L) de outros autores	94
Tabela 26 – Valores de referência dos constituintes sangüíneos de Fosfatase alcalina (AFL) (U/L) de outros autores	95
Tabela 27 – Valores de referência dos constituintes sangüíneos de gamma glutamiltransferase (GGT) (U/L) de outros autores	96
Tabela 28 – Valores de referência dos constituintes sangüíneos de aspartato aminotransferase (AST) (U/L) de outros autores	97
Tabela 29 – Valores de referência dos constituintes sangüíneos creatino fosfocinase (CK) (U/L) de outros autores	98
Tabela 30 – Valores de referência dos constituintes sangüíneos de cálcio total (tCa) (mg/dL) de outros autores	99
Tabela 31 – Valores de referência dos constituintes sangüíneos de Magnésio total (Mg) (mg/dL) de outros autores	100
APÊNDICE C.....	101
1. Constituição dos reagentes utilizados por técnica/Metodologia, preparação do reagente de trabalho e cálculos dos resultados	101
1.2. Proteínas totais	101
1.2.1. Técnica do biureto da Bioclin [®]	101
1.2.2. Técnica do biureto da Katal [®]	101
1.2.3. Técnica do biureto da In vitro-Human [®]	102
1.3. Albumina	102
1.3.1. Técnica do verde de bromocresol da Bioclin [®]	102
1.3.2. Técnica do verde de bromocresol da Katal [®]	103
1.3.3. Técnica do verde de bromocresol da In vitro-Human [®]	103
1.4. Creatinina	104
1.4.1 Técnica cinética colorimétrica de creatinina da Bioclin [®]	104
1.4.2. Técnica cinética colorimétrica de creatinina da katal [®]	104
1.4.3. Técnica cinética colorimétrica de creatinina da In Vitro-Human [®]	105
1.5. Uréia	106
1.5.1. Técnica cinética uv da Bioclin [®]	106
1.5.2. Técnica cinética uv da Katal [®]	106
1.5.3. Técnica cinética uv da In Vitro [®]	107
1.6. Glicose	108
1.6.1. Técnica enzimática colorimétrica de glicose da Bioclin [®]	108
1.6.2. Técnica enzimática colorimétrica de glicose da Katal [®]	108
1.6.3. Técnica enzimática colorimétrica de glicose da In Vitro-Human [®]	109
1.7. Bilirrubina total	109

1.8.1. Técnica colorimétrica de ponto final de bilirrubina da Bioclin®	109
1.7.2. Técnica colorimétrica de ponto final de bilirrubina da Katal®	110
1.7.3. Técnica colorimétrica de ponto final de bilirrubina da In vitro®	110
1.8. Creatina fosfocinase	111
1.8.1. Técnica cinética de CK da bioclin®	111
1.8.2. Técnica cinética de CK da Labtest®	112
1.8.3. Técnica cinética de CK da katal®	113
1.9. Fosfatase alcalina	114
1.9.1. Técnica cinética IFCC de fosfatase alcalina Bioclin®	114
1.9.2. Técnica cinética DGKC de fosfatase alcalina da katal®	114
1.9.3. Técnica cinética IFCC de fosfatase alcalina da In vitro®	115
1.10. Gamma-glutamilttransferase	115
1.10.1. Técnica da Bioclin – cinética – Szasz modificado®	115
1.10.2. Técnica cinética de γ -glutamilttransferase da Katal®	116
1.10.3. Técnica cinética de γ -glutamilttransferase da In Vitro®	116
1.11. Aspartato aminotransferase	117
1.11.1. Técnica cinética de aspartato aminotransferase da Bioclin®	117
1.11.2. Técnica cinética de aspartato aminotransferase da Katal®	117
1.11.3. Técnica cinética de aspartato aminotransferase da In vitro®	118
1.12. Cálcio	119
1.12.1. Metodologia arsenaso III da Bioclin®	119
1.12.2. Técnica cresolftaleína complexona de cálcio da In vitro®	119
1.12.3. Técnica cálcio arsenaso III da Labtest®	120
1.13. Cloretos	120
1.13.1. Técnica colorimétrica de cloretos da Bioclin®	120
1.13.2. Técnica titulométrica modificada de cloretos da In vitro®	121
1.13.3. Técnica colorimétrica de cloretos da Labtest®	121
1.14. Magnésio	122
1.15.1. Método de Mann e Yoe de magnésio da Bioclin®	122
1.14.2. Método automação de magnésio da In vitro®	122
1.14.3. Método magon sulfonado de magnésio da labtest®	123

LISTA DAS TABELAS

		páginas
01	Distribuição dos grupos experimentais pelos parâmetros avaliados e pelas empresas fornecedoras de kits comerciais.	56
02	Valores de proteínas séricas totais (g/dL) de eqüinos MM hígidos obtidos de amostras submetidas a diferentes tipos de técnicas e metodologias de análise.	61
03	Valores de proteína C reativa (PCR) (mg/dL) de eqüinos MM hígidos obtidos de amostras submetidas a diferentes tipos de metodologias de análise.	63
04	Valores de fosfatase alcalina (AFL) (U/L) de eqüinos MM hígidos obtidos de amostras submetidas a diferentes tipos de técnicas e metodologias de análise.	64
05	Valores de γ -glutamilttransferase (GGT) (U/L) de eqüinos MM hígidos obtidos de amostras submetidas a diferentes tipos de técnicas e metodologias de análise.	65
06	Valores de creatino fosfocinase (CK) (U/L) de eqüinos MM hígidos obtidos de amostras submetidas a diferentes tipos de técnicas e metodologias de análise.	67
07	Valores de cloretos (mEq/L) de eqüinos MM hígidos obtidos de amostras submetidas a diferentes tipos de metodologias e técnicas de análise.	68
08	Valores de cálcio total (t Ca) (mg/dL) de eqüinos hígidos obtidos de amostras submetidas a diferentes tipos de técnicas e metodologias de análise.	69

- 09 Valores de albumina (g/dL), uréia (mg/dL), creatinina (mg/dL) e glicose (mg/dL) de eqüinos MM hígidos obtidos de amostras submetidas a diferentes tipos de técnicas e metodologias de análise. **70**
- 10 Valores de aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina total (BT) e magnésio total (μ Mg) de eqüinos MM hígidos obtidos de amostras submetidas a diferentes tipos de técnicas e metodologias de análise. **71**
- 11 Valores de sódio (Na^+), potássio (K^+) de eqüinos MM hígidos obtidos de amostras submetidas a diferentes tipos de técnicas e análise. **71**

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Temperatura em graus centígrados
ALB	Albumina
AFL	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
APP	Proteínas de resposta positiva fase aguda
AST	Aspartato aminotransferase
BT	Bilirrubina total
Ca⁺²	Íons Cálcio
̄Ca	Cálcio total
CK	Creatino fosfocinase
Cl⁻	Íons cloretos
CREAT	Creatinina
dL	Decilitros
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
FEC	Fluído extracelular
FIC	Fluído intracelular
g	gramas
g/dL	gramas por decilitro
GGT	Gamma glutamiltransferase
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidade
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
K⁺	Íons potássio
LEC	Líquido extracelular
LDH	Desidrogenase láctica
LIC	Líquido intracelular
mEq/L	mili equivalente por litro
̄Mg	Magnésio total
Mg⁺²	Íons magnésio
mg	miligramas
mg/dL	miligramas por decilitro
mL	mililitros
MM	Mangalarga marchador

mmol/L	milimol por litro
Na⁺	Íons Sódio
PCR	Proteína c reativa
PFA	Proteínas de fase aguda
pH	Potencial Hidrogenionte
PPT	Proteínas totais
PSI	Puro sangue inglês
PTH	Paratormônio
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RFA	Resposta de fase aguda
U/L	Unidade por litro
UI/L	Unidade internacional por litro
UR	Ureia
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
µL	microlitros

RESUMO

CARDOSO, Carlos Antônio, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2008. **Comparação de kits comerciais na dosagem de constituintes bioquímicos do sangue em eqüinos hígidos.** Orientador: José Dantas Ribeiro Filho. Co-Orientadores: Tânia Toledo de Oliveira e Aloísio da Silva Pinto.

Kits comerciais das empresas Bioclin[®], Katal[®], In Vitro-Human[®] e Labtest[®] foram utilizados para a mensuração de constituintes bioquímicos e para verificar a influência dos mesmos sobre os valores de média dos parâmetros bioquímicos em 30 eqüinos Mangalarga Marchador, de ambos os sexos, adultos e hígidos. Para cada parâmetro de bioquímica clínica foram utilizados três diferentes técnicas, cada uma delas representada por um kit comercial. Para cada eletrólito foram realizadas as dosagens através de duas metodologias distintas fotometria de chama e Íon eletrodo seletivo. Para as proteínas marcadoras de fase aguda, a proteína c reativa foi escolhida, por ser a mais utilizada em medicina humana, e para sua dosagem três metodologias diferentes foram escolhidas nefelometria, imunoturbidimetria e aglutinação em látex. Os kits utilizados nestas dosagens são os mesmos utilizados nas dosagens de rotina nos laboratórios para bioquímica clínica, eletrólitos e proteínas de fase aguda. Foram determinados os valores de glicose (GLI), proteínas totais (PPT), albumina (ALB), proteína c reativa (PCR), bilirrubina total (BT), uréia (UR), creatinina (CREAT), fosfatase alcalina (AFL), creatino fosfo cinase (CK), Y-glutamil transferase (GGT), aspartato amino transferase (AST), sódio (Na⁺), potássio (K⁺), cloretos (Cl⁻) magnésio total (Mg⁺²) e cálcio total (iCa). Não houve diferença significativa para os valores de albumina, uréia, creatinina, glicose, aspartato aminotransferase, bilirrubina total, potássio e sódio, não existindo, portanto, restrições para utilização no auxilio diagnóstico em medicina veterinária de qualquer um dos kits avaliados. Nas dosagens de proteínas totais, o kit da Katal[®] apresentou valor de média de 7,72mg/dL superior aos valores de média de Bioclin[®] e de In Vitro-Human[®]. A fosfatase alcalina quando mensurada através do kit da In Vitro-Human[®], apresentou diferença significativa, com valor de média de 370,41U/L, superior aos valores de

média de Bioclin[®] e Katal[®]. Para a Creatino fosfocinase o kit da Katal[®], apresentou diferença significativa com valor de média de 355,10U/L, maior que os valores de média de Bioclin[®] e Labtest[®]. A enzima gamma glutamil transferase quantificada pelo kit da Katal[®] obteve valor de 23,80U/L, apresentou diferença significativa, com valor de média superior aos valores de média de Bioclin[®] e In Vitro-Human[®]. O íon cloreto apresentou o valor de média de 94,20mEq/L, para o kit da Labtest[®], significativamente menor do que os valores de Bioclin[®] e In Vitro-Human[®]. O cálcio total apresentou diferença entre os três kits utilizados sendo o maior deles 11,66mg/dL o obtido com o kit da In Vitro-Human[®], de 10,95mg/dL da Bioclin[®] e de 9,88mg/dL obtido com o kit de Labtest[®]. Portanto, os kits da Katal[®] para proteínas totais e gamma glutamil transferase, da Labtest[®] para cloretos, da In Vitro-Human[®] para fosfatase alcalina e de proteína c reativa em látex da Bioclin[®], devem ser utilizados com cautela quando forem utilizados para o auxílio diagnóstico para equinos.

ABSTRACT

CARDOSO, Carlos Antônio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2008. **Kits comparison commercial in the constituents blood biochemical dosage in healthy horses.** Adviser: José Dantas Ribeiro Filho, Co-Advisers: Tânia Toledo de Oliveira e Aloísio da Silva Pinto.

Commercial kits of Bioclin[®] Company, Katal[®], In Vitro-Human[®] and Labtest[®] were used to measure the biochemical constituents and to verify their influence on the values of the biochemical parameters average on 30 mangalarga marchador horses, of both sex, adults and healthy. For every clinic biochemical parameter, it was used three different techniques, each one of them represented by one commercial kit. For each electrolyte it was performed dosages through two different methodologies, flame photometry and selective electrode ion. For the marking protein of acute phase, the C reactive protein was chosen, since it is the most used for human medicine and for its dosage, three different methodologies were chosen: nephelometry, immunoturbidimetry and agglutination on latex. The kits used for these dosages are the same used for the routine dosages on clinic biochemical laboratories, electrolytes and protein of acute phase. It was determined the glucose (GLI) values, total protein (PPT), albumin (ALB), C reactive protein (PCR), total bilirubin (BT), urea (UR), creatinine (CREAT), alkaline phosphatase (AFL), creatine phosphokinase (CK), Y-glutamyl transferase (GGT), aspartate aminotransferase (AST), sodium (Na⁺), potassium (K⁺), Chloride (Cl⁻), total magnesium (Mg⁺²) and total calcium (tCa). There was no significant difference on albumin, urea, creatinine, glucose, aspartate aminotransferase, total bilirubin, potassium and sodium, therefore, there not having, therefore, restrictions for the use on auxiliary diagnostic on veterinarian medicine of anyone of the analyzed kits. On total protein dosages, the Katal[®] kit presented mean value of 7.72 mg/dl, higher than the mean values of Bioclin[®] and In Vitro-Human[®]. The alkaline phosphatase as measured through the kit of In Vitro-Human[®], presented significant difference having mean value of 370.41 U/L higher than mean values of Bioclin[®] and Katal[®]. For the creatine phosphokinase, the kit of Katal[®] presented significant difference having mean value of 355.10 U/L, higher than the mean values of Bioclin[®]

and Labtest[®]. The glutamil gamma transpherase enzyme, quantified by the kit of Katal[®], got values of 23.80U/L, presented significant difference, having mean value higher than the mean values of Bioclin[®] and In Vitro-Human[®]. The Clorets ion presented the mean value of 94.20mEq/L, for the Labtest[®] Kit, considerably lower than the Bioclin[®] and In Vitro-Human[®] values. The total Calcium presented difference among the three kits used. The higher of them 11.66mg/dL, the one obtained with the In Vitro-Human[®] kit, 10.95mg/dL the one obtained with the Labtest[®] kit. Therefore, the Katal[®] kits for total protein and gamma glutamil transferase, from Labtest[®], for clorets from In Vitro-Human[®], for alkaline phosphatase and C reactive protein in latex from Bioclin[®], must be used with caution when used as auxiliary diagnoses on horses.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com STOCHAN e SCOTT (1995), a razão para a utilização do laboratório seria detectar um estado patológico indefinido; definir, classificar ou confirmar uma desordem patofisiológica ou um estado de doença; verificar alterações no estado patológico do paciente devido à progressão natural da doença ou acompanhar a terapia.

As análises bioquímicas, unidas ao exame físico e a anamnese, constituem a trilogia na qual se deve apoiar o veterinário para elaborar o diagnóstico, efetuar o prognóstico correto e monitorar a evolução do paciente e sua resposta ao tratamento. As provas de laboratório permitem usualmente confirmar ou descartar o diagnóstico presuntivo e tem um papel preponderante especialmente na clínica (COPPO e MUSSART, 2000).

Os exames bioquímicos realizados com amostras de plasma e soro sanguíneos são importantes ferramentas para o auxílio diagnóstico de diversas enfermidades que acometem os animais domésticos (DORETTO, 1996; KANEKO *et al.*, 1997). Os parâmetros de bioquímica clínica funcionam como indicadores dos processos adaptativos do organismo, no metabolismo energético, protéico e mineral, além de oferecer indicativos na interpretação do funcionamento hepático, renal, pancreático, ósseo, muscular, cardíaco, do sistema nervoso central e do trato gastrintestinal (GONZÁLEZ e SILVA, 2003).

A interpretação do perfil bioquímico é complexa tanto aplicada a rebanhos quanto a indivíduos, devido aos mecanismos que controlam a concentração sanguínea de vários metabólitos e devido, também, a grande variação desses níveis em função de fatores como raça, idade, stress, dieta, de produção leiteira, manejo, clima e estado fisiológico (lactação, gestação, estado reprodutivo) (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

As análises laboratoriais, incluindo exames bioquímicos, tornaram-se fundamentais na avaliação do equino em competição, transformando-se em ferramentas decisivas para o acompanhamento do equino atleta. Para tanto, torna-se imprescindível o conhecimento dos valores padrões de referência para a adequada interpretação dos resultados bioquímicos, além do

conhecimento das alterações decorrentes do esforço físico de diferentes intensidades (BALARIN *et al.*, 2005).

Valores de referência são observações realizadas em um indivíduo ou em grupos de indivíduos num definido estado de saúde (LUMSDEN *et al.*, 1980). Os valores de referência tornam-se importantes ferramentas na avaliação do diagnóstico e no estabelecimento do prognóstico de muitas enfermidades, que acometem os equinos (LUMSDEN *et al.*, 1980). Cada fabricante de *kit* utilizado deverá estabelecer os valores de referência para cada uma das espécies a serem avaliadas.

A base do diagnóstico clássico segue sendo “ver, palpar e escutar”, porém modernamente a aspiração primordial do clínico é reconhecer uma enfermidade na forma mais precoce possível. As provas de laboratório, muitas vezes indispensáveis, proporcionam valiosos pilares diagnósticos, especialmente quando os achados clínicos são vagos. O laboratório objetiva os resultados corroborando o diagnóstico e assegurando ajuda mais rápida e eficaz ao paciente. Noutro aspecto, haverá a satisfação pessoal do veterinário de haver feito o melhor possível para o enfermo e se refletirá na confiança do proprietário do animal ao veterinário atuante (COPPO e MUSSART, 2000).

O conhecimento das concentrações fisiológicas dos constituintes bioquímicos dos equídeos nas suas diferentes fases da vida constitui a base para a avaliação das alterações patológicas nos quadros mórbidos, facilitando o diagnóstico das enfermidades (SCHALM *et al.*, 1975; HARVEY *et al.*, 1984). Nas enfermidades, os valores sanguíneos normais podem sofrer alterações que, de modo geral, nem sempre são características de determinada doença, mas, em certos casos, podem ser específicas e, portanto, fornecer preciosos elementos de diagnóstico. Essas alterações às vezes aparecem antes dos primeiros sinais clínicos, permitindo assim a identificação precoce da doença ou de sua forma subclínica (MESSER, 1995).

O perfil laboratorial mais moderno para bioquímica inclui a dosagem de todos os eletrólitos importantes, a dosagem de dióxido de carbono total e a dosagem da concentração de proteínas totais (STAMPFLI e CARLSON, 2001).

Para a correta interpretação dos perfis metabólicos, é indispensável contar com valores de referência apropriados para a região e a população em particular. Em caso de não contar com esses dados, os valores referenciais a serem usados devem ser de zonas climáticas e grupos de animais similares (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

Um estudo retrospectivo efetuado no Hospital Escuela de Corrientes sobre 130 histórias clínicas, revelou que em 54,4% dos casos, o diagnóstico inicial foi modificado a partir dos dados obtidos por provas complementares, entre as pertinentes à bioquímica clínica. A diversidade de espécies, raças e sistemas de alimentação e manejo dificultam a interpretação dos dados do diagnóstico complementar. (COPPO e MUSSART, 2000).

O diagnóstico diferencial precoce, especialmente em enfermidades orgânicas e metabólicas, dificilmente será encontrado sem o auxílio do laboratório. O quadro bioquímico vai variar segundo o momento evolutivo da enfermidade e muitas vezes vão coexistir com duas ou mais afecções. Algumas provas de laboratório úteis para a patologia humana não seriam confiáveis para serem aplicadas aos animais (COPPO e MUSSART, 2000).

As análises bioquímicas não devem ser exigidas sem motivo justificado, nem ter o objetivo de substituir o exame físico metódico; só vão ter valor quando o clínico se achar em condições de saber interpretar os resultados. O clínico deverá ter conhecimento dos valores de referência de cada espécie, para cada idade e sexo, assim como considerar variações próprias das diferentes patologias da medicina interna. Aos fatores limitantes deveriam ser agregados os distintos estados fisiológicos (crescimento, gestação, lactação, envelhecimento), assim como o ritmo circadiano (COPPO e MUSSART, 2000).

LOPES (1993) e COSTA (2003), no Brasil, observaram diferenças significativas na concentração sérica das enzimas aspartato amino transferase (AST), desidrogenase láctica (LDH) e γ -glutamilttransferase (GGT) em equinos puro sangue inglês (PSI) sadios, em relação aos valores de referência de autores estrangeiros e enfatizaram a necessidade de cada laboratório determinar seus valores de referência.

Vários são os elementos sanguíneos cujas dosagens permitem avaliar o estado de sanidade dos animais. A uréia (UR) e a creatinina (CREAT)

permitem avaliar a função renal (CARLSON, 1993). A determinação da albumina sérica, das bilirrubinas e das enzimas alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (AFL) e, especialmente Y-glutamilttransferase (GGT) é importante no auxílio ao diagnóstico das hepatopatias, já que o fígado é um órgão difícil de ser avaliado pelo exame físico (PINSENT e EDDY, 2004). A verificação da atividade da creatino fosfo cinase (CK) permite avaliar a função muscular, enquanto a determinação das proteínas totais e da albumina pode auxiliar no diagnóstico de algumas disfunções nutricionais.

Os resultados dos exames laboratoriais podem sofrer alterações devido às variações pré-analíticas (idade, espécie, estresse, hidratação, dieta, estado reprodutivo, estase venosa, utilização de drogas, localização geográfica, coleta da amostra e sua manipulação) e analíticas, ou às variações biológicas normais em diferente conformidade com processos patofisiológicos (XIMENES *et al.*, 1984; SARTOR *et al.*, 1985; CARLSON, 1993; MEYER e HARVEY, 1998; ZHANG *et al.*, 1998). Dentre as variações na fase analítica estão às variações das metodologias e/ou das técnicas utilizadas em cada um dos *kits* comerciais.

Além dos fatores mencionados, devem ser também consideradas a dieta, a atividade física do animal e as características ambientais locais, como temperatura, altitude, solo e umidade do ar (MUNDIM *et al.*, 2004). Para que as alterações patológicas sejam estabelecidas, as variações pré-analíticas e analíticas devem ser reduzidas a ponto de não influenciarem a interpretação dos resultados (ONO *et al.*, 1981; LINDNER e BAUER, 1993; ZHANG *et al.*, 1998).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Líquidos corporais

O estudo da composição bioquímica do sangue é de longa data, principalmente vinculada à patologia clínica em casos individuais (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002). Na década de 1970, Payne e colaboradores em Compton (Inglaterra), ampliaram a utilização deste estudo mediante conceito de perfil metabólico, isto é, a análise de componentes sanguíneos aplicados a populações (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002). O

trabalho de Payne, aplicado inicialmente a rebanhos leiteiros, foi ampliado a outras espécies, com aplicações práticas no manejo alimentar.

Aproximadamente 60% a 70% do peso corporal dos equinos são constituídos por água (JOHNSON, 1995; STEWART, 1998), estando esta dividida nos compartimentos intra e extracelular (FREESTONE, 1993; STEWART, 1998). O fluido intracelular representa aproximadamente 40% do peso corporal, enquanto o extracelular representa cerca de 20% a 30% (FREESTONE, 1993; STEWART, 1998) e pode ser subdividido em plasma, fluido intersticial e transcelular (STEWART, 1998).

2.1.1. Plasma

A composição bioquímica do plasma sanguíneo reflete de modo fiel a situação metabólica dos tecidos animais, de forma a poder avaliar lesões teciduais, transtornos no funcionamento de órgãos, adaptação do animal diante dos desafios nutricionais e fisiológicos e de desequilíbrios metabólicos específicos de origem nutricional (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

O plasma corresponde a 55% e 70% do sangue total. Além da água, o maior constituinte do sangue, o plasma contém gases, minerais e uma variedade de constituintes orgânicos, nitrogenados ou não, como também enzimas, hormônios, vitaminas e seus derivados coenzimáticos, metabólitos variados e produtos do metabolismo da detoxicação (BACILA, 2003).

Algumas dosagens podem ser realizadas simultaneamente no plasma ou soro, vai depender da indicação da metodologia empregada para a realização do mesmo. O plasma é obtido com a utilização de tubos contendo anticoagulantes, tais como citrato, fluoreto, etc.

2.1.2. Soro

A diferença analítica entre soro e plasma é que o primeiro não contém fibrinogênio, que é utilizado para formação do coágulo. O soro é obtido a partir de sangue coletado sem anticoagulantes e pode ser utilizado para as dosagens bioquímicas. No caso de utilização do soro, é necessário um período de 30 a 180 minutos para a formação do coágulo e a sua completa obtenção (BLOOD e STUDDERT, 2002; GONZÁLEZ e SILVA, 2003).

Quando uma amostra de soro é submetida à análise, uma série de fatores pode levar a resultados pouco acurados. Soros hemolisados ou lipêmicos não são ideais para a realização de dosagens bioquímicas, e os resultados obtidos podem variar muito em relação ao método ou à aparelhagem utilizada e em relação aos parâmetros normais (O'NEILL e FELDMAN, 1989).

A interpretação do perfil bioquímico é complexa tanto aplicada a rebanhos quanto a indivíduos, devido aos mecanismos que controlam o nível sanguíneo de vários metabólitos e devido também, a grande variação desses níveis em função de fatores como raça, idade, stress, dieta, nível de produção leiteira, manejo, clima e estado fisiológico (lactação, gestação, estado reprodutivo) (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002). A presença de um soro límpido, sem lipemia, hemólise ou icterícia favorece as dosagens séricas.

2.2. Proteínas

2.2.1. Importância clínica

Elementos celulares essenciais, constituídas de moléculas extremamente volumosas formadas de longas cadeias de amino ácidos unidos por ligações peptídicas (MILLER e GONÇALVES, 1999).

Proteínas são compostos de alto peso molecular, consistindo primariamente de cadeias de amino ácidos unidos por ligações peptídicas. As proteínas são macromoléculas biológicas mais abundantes, ocorrendo em todas as células e em todas as partes delas (LHENINGER *et al.*, 1995). As proteínas plasmáticas ocupam uma posição central e dominante no metabolismo protéico, devido a sua íntima relação com o metabolismo hepático e às interações com outros tecidos, por todo o corpo (COLES, 1984). As proteínas plasmáticas são, sem dúvida, as fontes protéicas mais facilmente disponíveis no corpo do animal para estudo.

As proteínas podem ser divididas em duas grandes classes, com base em sua forma e em certas características físicas: proteínas globulares e fibrosas. Quase todas as enzimas são proteínas globulares, como também o

são as proteínas sanguíneas de transportes, os anticorpos e as proteínas de reserva nutritiva (LEHNINGER *et al.*, 1995).

As proteínas plasmáticas são constituídas de polímeros a partir de 22 amino ácidos conectados linearmente por ligações peptídicas em combinações diferenciadas, apresentando funções específicas ao tecido de sua síntese (SWENSON e REECE, 1996).

De acordo com COLES (1984), o principal local de síntese de proteínas plasmáticas – albumina, fibrinogênio, protrombina, alfa e beta-globulinas – é o fígado. Em geral, o soro sanguíneo contém cerca de 7,0 g/dL de proteínas. As funções das proteínas no organismo são inúmeras: manutenção da pressão osmótica, catálise de reações bioquímicas, manutenção do equilíbrio ácido-base, coagulação sanguínea, nutrição e defesa do organismo (KANEKO *et al.*, 1997).

Evidências afirmam que as proteínas globulares sofrem desnaturação quando aquecidas, expostas a valores extremos de pH (potencial Hidrogenionte), ou tratadas com uréia (LEHNINGER *et al.*, 1995). Uma vez que ocorre desnaturação, as atividades protéicas são afetadas, de modo irreversível (KANEKO *et al.*, 1997).

2.2.2. Proteínas plasmáticas totais (PPT)

2.2.2.1. Conceito e importância clínica

As principais proteínas plasmáticas são a albumina, as globulinas e o fibrinogênio. Elas estão envolvidas em múltiplas funções, tais como a manutenção da pressão osmótica e viscosidade do sangue, o transporte de nutrientes, metabólitos, hormônios e produtos de excreção, a regulação do pH sanguíneo e a participação na coagulação sanguínea. As proteínas sanguíneas são sintetizadas principalmente pelo fígado, sendo que a taxa de síntese está diretamente relacionada com estado nutricional do animal, especialmente com os níveis de proteína e de vitamina A, e com a funcionalidade hepática (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

Proteínas totais e suas frações assumem extraordinária importância clínica, uma vez que a concentração protéica total no plasma é responsável pela sua pressão coloidosmótica e as variações observadas nas diversas

frações podem refletir doenças específicas e trazer valiosos subsídios para o seu diagnóstico (MILLER e GONÇALVES, 1999).

Qualquer anormalidade nas proteínas totais indicará a ocorrência de algum fator responsável, seja ele patológico, fisiológico ou de qualquer outra origem. O estudo do equilíbrio hídrico de um animal pode ser avaliado se utilizarmos a estimativa dos níveis de proteínas totais. Esta prova juntamente com a determinação do volume globular e/ou hemoglobina, tem valor na determinação da ausência ou presença (e grau) de desidratação. Pode ser utilizada na avaliação do estado nutricional. Pode ainda refletir alterações metabólicas na concentração das proteínas totais e podem ser indicativos de doenças. Podemos observar alteração nos valores de proteínas totais, em associação com hepatopatias e nefropatias, que auxiliam tanto no diagnóstico como prognóstico. A diminuição nos valores séricos das proteínas plasmáticas, ou seja, hipoproteïnemia são advindos de ingestão inadequada de nutrientes, perda excessiva de proteínas, resultantes de queimaduras, feridas, proteinúria ou aumento na degradação protéica por gliconeogênese. Existe alguma evidência do decréscimo de proteínas com gravidez e lactação (COLES, 1984).

As proteínas podem estar diminuídas na síndrome da mal absorção, na cirrose hepática, na síndrome nefrótica, na sobreidratação, nas enteropatias, em animais jovens e nas hemorragias (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

As proteínas totais podem estar aumentadas na desidratação, na perda de fluídos corporais, nas infecções, nos tumores, no choque, em animais mais velhos e na presença de hemólise na amostra a ser utilizada (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

2.2.2.2. Descrição do método do biureto dosagem de proteínas totais

As proteínas do soro formam, através das suas ligações peptídicas complexos corados com os íons cúpricos em meio alcalino contidos no reagente de biureto. Os complexos resultantes apresentam máximo de absorção em 545 nm e a intensidade da cor formada é proporcional à concentração de proteínas no meio. O método proposto é facilmente

automatizável adaptando-se a todos os analisadores automáticos disponíveis (LIMA *et al.*, 1985).

2.2.2.3. Metabolismo de proteínas totais e albumina

A ingestão de compostos nitrogenados e o balanço de nitrogênio nos animais envolve tanto a ingestão e metabolismo de amino ácidos e as proteínas ingeridas. A dieta contém muito pouco amino ácido livre e amônia.

A unidade fundamental das proteínas são os amino ácidos, os essenciais formam o grupo que não é sintetizado pelos animais e devem ser fornecidos na dieta: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, triptofano, fenilalanina e valina.

Os amino ácidos não essenciais são aqueles que são sintetizados por animais, através da transaminação dos esqueletos de carbono, dessa maneira o alfaceto glutarato do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) é transaminado pelo ácido glutâmico que aceita o amino grupo da alanina que se transforma em piruvato. A enzima responsável por catalisar esta reação é a alanino aminotransferase (ALT).

Os amino ácidos são unidos através de ligações peptídicas para a síntese de proteínas dentro das células, no retículo endoplasmático rugoso (RER) através da transcrição e tradução, onde as proteínas são sintetizadas utilizando os amino ácidos disponíveis no citoplasma.

Proteínas dos tecidos e do plasma estão constantemente sendo degradadas em seus constituintes, os amino ácidos e se tornam fonte de energia, assim como fonte de carboidratos e de carbono. Carnívoros derivam de 40% a 50% do seu requerimento de energia da dieta de proteína e seus amino ácidos, enquanto que os onívoros e herbívoros derivam somente de 10% a 20%. (LEHNINGER *et al.*, 1995).

As proteínas ingeridas são degradadas por proteases no estômago e no intestino delgado. A maioria dessas proteases é inicialmente sintetizada como zimogênio inativo, que é ativado no estômago ou intestino pela remoção proteolítica de partes de suas cadeias polipeptídicas. Um passo precoce no catabolismo de amino ácidos é a separação do grupo amino do esqueleto carbônico. Na maioria dos casos, o grupo amino é transferido para o alfa cetoglutarato para formar glutamato. Este tipo de reação é chamado

de transaminação e requer a coenzima piridoxal fosfato. O glutamato é transportado para as mitocôndrias do fígado, onde o grupo amino é liberado como amônia pela enzima glutamato desidrogenase. A amônia formada em outros tecidos é transportada até as mitocôndrias do fígado como nitrogênio, amida da glutamina ou como o grupo amino da alanina. A maior porção dessa alanina é gerada nos músculos e transportada no sangue até o fígado. Depois de sofrer desaminação o piruvato resultante é convertido em glicose, que é transportada de volta ao músculo como parte do ciclo glicose-alanina.

Depois da remoção dos grupos amino por transaminação com o alfa cetoglutarato, os esqueletos carbônicos dos amino ácidos sofrem oxidação em compostos que podem entrar no ciclo do ácido cítrico para serem oxidados até gás carbônico e água.

Alguns amino ácidos podem ser convertidos em corpos cetônicos; alguns podem ser convertidos em glicose (LEHNINGER *et al.*, 1995).

2.3. Albumina

2.3.1. Conceito e importância clínica

A albumina é a proteína mais abundante no plasma, perfazendo cerca de 50% do total de proteínas. Tem um peso molecular aproximado de 66 KD. É sintetizada no fígado e contribui em 80% com a osmolaridade do plasma sanguíneo. A albumina também tem função importante na regulação do potencial Hidrogenionte (pH) sanguíneo, reserva protéica e atua também como transportadora de: ácidos graxos livres, amino ácidos, metais, cálcio, hormônios e, atua como ânion (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

A albumina é uma proteína globular hidrossolúvel. É sintetizada no fígado, pelos hepatócitos, e catabolizada nos tecidos periféricos, sendo a principal responsável pela manutenção da pressão osmótica intravascular. Dois terços da albumina corporal estão no compartimento extravascular e apenas um terço, no intravascular (FENNER, 2003).

A albumina constitui cerca de 40% a 60% da concentração total de proteínas séricas em animais sadios. Além da pressão osmótica, pode agir como fonte primária de amino ácidos de reserva para as proteínas tissulares.

Devido à sua grande capacidade de ligação com outras substâncias, evita a excreção precoce de algumas drogas, auxiliando também no processo de detoxicação e inativação de compostos que possam ser tóxicos ao organismo animal. A albumina também desempenha importante papel no transporte de ácidos graxos (COLES, 1984).

O nível de albumina pode ser indicador do conteúdo de proteína na dieta, muito embora as mudanças ocorram lentamente. Para a detecção de mudanças significativas na concentração de albumina sérica é necessário um período de pelo menos um mês, devido à baixa velocidade de síntese e de degradação (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

A hipoalbuminemia nem sempre é identificada, pois, os processos hemostáticos operam no sentido de minimizar as alterações na sua concentração plasmática. Pode ser consequência de absorção deficiente de proteínas, síntese deficiente de albumina, excessiva degeneração protéica ou, perda de albumina. Animais parasitados frequentemente apresentam queda nos valores de albumina sérica (COLES 1984).

A albumina pode estar diminuída no dano hepático crônico, no déficit alimentar de fontes protéicas, no parasitismo gastrointestinal, doença renal (síndrome nefrótica, glomerulonefrite crônica, diabetes), na síndrome da má absorção, em hemorragias e na sobreidratação (iatrogênico) (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002). O fígado é o único sítio de síntese de albumina e a hipoalbuminemia é uma importante característica de doença hepática crônica (KANEKO *et al.*, 1997).

A hipoalbuminemia pode afetar o metabolismo de outras substâncias devido ao papel da albumina como transportador, além de causar queda da pressão osmótica do plasma e levar a ascite, geralmente quando a concentração de albumina cai para menos de 20g/L (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

A albumina pode estar aumentada na desidratação e na perda excessiva de fluidos (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

2.3.2. Descrição do método para a dosagem de albumina

A albumina forma um complexo com o verde de bromocresol em pH ácido modificando a absorção espectral deste corante. É o princípio do erro

protéico dos indicadores. A absorção em 630nm do complexo é proporcional à concentração de albumina na amostra. O método proposto é facilmente automatizável, adaptando-se a todos os analisadores automáticos disponíveis (KANEKO *et al.*, 1997) (LIMA *et al.*, 1985).

2.4. Proteínas marcadoras de fase aguda

2.4.1. Resposta de fase aguda (RFA)

2.4.1.1. Conceito e importância clínica

O termo resposta de fase aguda (RFA) refere-se à resposta inflamatória que ocorre logo após alguma injúria dos tecidos (KUSHNER, 1982; DINARELLO, 1984 ; RAYNES, 1994; BAUMANN e GAULDIE, 1994; PANNEN e ROBOTHAM, 1995; KOJ, 1996). A RFA é inespecífica pela natureza: sendo que a origem da injúria pode ser infecciosa, imunológica, neoplásica, parasitária ou outras (KUSHNER e MACKIEWICZ, 1987; STANDNYK e GAULDIE, 1991). O termo RFA refere-se às trocas nas concentrações de um grande número de proteínas do plasma que estão associados à resposta do hospedeiro. Estas trocas são predominantemente o resultado de alterações no padrão da síntese destas proteínas no fígado (PANNEN e ROBOTHAM, 1995).

A finalidade da RFA é prevenir a injúria de um órgão, para isolar e destruir um microorganismo infeccioso, para remover moléculas e fibrina para ativar os mecanismos de reparo para o retorno do órgão à sua função normal (DINARELLO, 1984; BAUMANN e GAULDIE, 1994).

Do ponto de vista tecnológico, RFA é um evento primitivo que permite a sobrevivência e a manutenção da homeostase fisiológica durante o período subsequente à injúria (DINARELLO, 1984).

A RFA é parte de resposta imune não específica, e estes componentes são relativamente consistentes apesar da grande variedade de condições que as provoca. A RFA é seguida pela resposta imune específica que, em contraste, é seletiva (PYÖRÄLÄ *et al.*, 1994).

O início da RFA se dá no local da injúria. A cascata inflamatória é usualmente iniciada pelas células mononucleares, por exemplo, macrófagos

ou monócitos. São hábeis para liberar um espectro de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, mediadores lipídicos, aminas vasoativas, componentes do complemento, espécies reativas ao oxigênio e óxido nítrico (OLSON *et al.*, 1995). Os mediadores inflamatórios atuam nas reações de maneira local e sistêmica. No local da reação, inclui o aumento da permeabilidade capilar e infiltração de leucócitos para a área de inflamação. O aumento da permeabilidade capilar permite o transporte de diferentes moléculas entre a circulação e a área da injúria ao tecido. Estas moléculas consistem de muitas proteínas plasmáticas, tais como inibidoras da proteinase, proteínas transportadoras e outras proteínas ligantes. Muitos íons são transferidos para a área, como exemplo, sódio e cloreto. A migração de leucócitos para o sítio inflamatório é regulada pela sua adesão ao endotélio. A aderência dos leucócitos para o endotélio é seguida pela diapedese dos leucócitos e sua migração para o foco inflamatório está sendo guiada por diferentes fatores quimiotáticos. Células fagocíticas, neutrófilos granulócitos e macrófagos têm a função chave na eliminação dos antígenos. Esta função é baseada na fagocitose, hidrolase dos lisossomos e radicais oxigênio. Dois radicais oxigênicos fornecidos pelo anion superóxido (O_2^-) e óxido nítrico podem também ser convertidos em peroxilnitrito ($ONOO^-$), o qual foi recentemente considerado o maior agente citotóxico (PAAPE e CAPUCO, 1997).

Citoquinas são polipeptídios multipotentes produzidos por vários tipos de células. Sua síntese é iniciada por mediadores, os quais induzem a cascata de transdução de sinal, transcrição de genes de citocina, translação dentro do polipeptídio citocina, processamento e secreção (KOJ, 1996).

A resposta de fase aguda (RFA) é clinicamente caracterizada pelos sinais sistêmicos da inflamação febre, inapetência e depressão. Os sinais refletem múltiplas trocas no controle homeostático do animal doente (PYÖRÄLÄ *et al.*, 1994). A RFA inclui trocas endocrinológicas, metabólicas, hematológicas e neurológicas (PYÖRÄLÄ *et al.*, 1994).

2.4.2. Proteínas de fase aguda (Proteína C-reativa)

2.4.2.1. Conceito e importância clínica

A resposta de fase aguda altera a síntese e a liberação de muitas proteínas sintetizadas pelo fígado, algumas diminuem e outras aumentam. Essas proteínas que diminuem são denominadas proteínas de fase aguda negativas. Pertencem a este grupo a albumina e muitas outras proteínas ligantes, como a transferrina e a proteína ligadora de retinol (JAIN, 1993; GRUYS *et al.*, 1994; HAYES, 1994,). Já as proteínas que aumentam em mais de 25% sua concentração são denominadas proteínas de fase aguda positivas ou, simplesmente, proteínas de fase aguda (KUSHNER, 1982).

A síntese e a liberação das proteínas de fase aguda (PFA) do fígado são reguladas pelos mediadores do processo inflamatório. Estes mediadores são enquadrados em quatro categorias: citocinas interleucinas tipo 1 (IL-1), citocinas interleucinas tipo 6 (IL-6), glicocorticóides e os fatores de crescimento. As citocinas estimulam a expressão gênica para a síntese de proteínas de fase aguda (PFA), enquanto que os glicocorticóides e os fatores de crescimento funcionam mais como moduladores da ação das citocinas (BAUMANN e GAULDIE, 1994). A citocina interleucina 6 (IL-6) tem sido reconhecida como principal regulador dos genes APP (proteínas de fase aguda positivas). As proteínas de fase aguda produzidas são denominadas APP (Proteínas positivas de fase aguda), são denominadas do tipo 2, que na maioria das espécies incluem o fibrinogênio, haptoglobinas (Hp) e pelo menos uma semelhante às α 1-inibidoras de proteinases (α 1-PI). Os genes reguladores de IL-1 são diferentes dos da IL-6. As proteínas de fase aguda PFA tipo 1, incluem α 1-glicoproteína ácida (α 1-Ag), amilóide sérica A (SAA) e proteína C-reativa (PCR), essa expressão gênica vai variar de acordo com a espécie (BAUMANN e GAULDIE, 1994; NAKAGAWA-TOSA *et al.* 1995; PANNEM e ROBOTHAM, 1995). Nos bovinos a haptoglobina é estimulada pela IL-6 e não pela IL-1 (NAKAGAWA-TOSA *et al.* 1995).

O perfil das proteínas de fase aguda varia nas diferentes espécies animais (KUSHNER, 1982; HAYES, 1994) e também dentro de uma mesma

espécie. Os perfis podem ser afetados pela idade, sexo, gestação e polimorfismo (ALSEMGEEEST *et al.*, 1993, HAYES, 1994).

As primeiras proteínas de fase aguda (PFA) são produzidas dentro de poucas horas após a injúria ao tecido, e o seu pico pode ser atingido dentro de um dia após a injúria do tecido (BOOSMAN *et al.*, 1989).

Em algumas doenças inflamatórias, certas proteínas de fase aguda (PFA) podem ser mais ativamente consumidas, apesar da elevada meia-vida, resultando dessa maneira em um nível relativamente baixo, considerando o estágio da inflamação (THOMPSON *et al.*, 1992). A maioria das proteínas de fase aguda (PFA) usadas na clínica médica veterinária, sua cinética e comportamento em diferentes condições patológicas não tem sido descritos (HAYES, 1994).

A proteína c reativa (PCR) e amilóide sérica P (SAP) são membros da família pentraxina das proteínas do plasma com características pentamérica. As pentraxinas são hábeis em limpar o material nuclear liberado dos tecidos necrosados, elas também estão envolvidas na opsonização, ativação da via clássica do complemento e o enriquecimento da fagocitose (COOPER, 1990; RAYNES, 1994; STEEL e WHITEHEAD, 1994; PANNEN e ROBOTHAM, 1995; TABEL, 1996). A proteína c reativa (PCR) e amilóide sérica P (SAP) são as maiores proteínas positivas de fase aguda (APP) em humanos, mas uma resposta relativamente baixa em bovinos (MADSLEY *et al.*, 1987, SARIKAPUT *et al.*, 1992).

Membros da família da amilóide sérica A (SAA) são pequenas apolipoproteínas que estão associadas ao HDL (Lipoproteínas de alta densidade), e atuam durante a resposta de fase aguda (APR) (COOPER, 1990; PANNEM e ROBOTHAM, 1995).

A amilóide sérica A (SAA) é considerada proteína de fase aguda positiva (APP) em humanos e também em bovinos (HAYES, 1994, YAMAMOTO *et al.*, 1998). Apesar da natureza da resposta de fase aguda (APR), são numerosas as diferenças das características entre as diversas espécies animais. O fenômeno é pobremente conhecido. A proteína mais importante varia muito dependendo da espécie e também da enfermidade (STEEL e WHITEHEAD, 1994).

A indicação mais óbvia para o uso das proteínas de fase aguda positivas (APPs) é o diagnóstico clínico. As APPs podem servir como indicadores de doenças subclínicas dentro do rebanho ou para um único indivíduo. Em casos clínicos, proporcionam uma importante informação adicional para melhorar o diagnóstico e auxiliar no prognóstico (PYÖRÄLÄ *et al.*, 1994). SCOTT *et al.*, (1992) definiram que valores séricos de haptoglobina (Hp) têm valor prognóstico em ovinos para indicar sobrevida.

Em veterinária, assim como em medicina humana, é essencial a compreensão da patofisiologia da resposta inflamatória do hospedeiro. Por esta razão, a compreensão da resposta de fase aguda (RFA) é importante no acerto do diagnóstico e para a tomada de decisão para iniciar tratamentos. O mais importante papel diagnóstico da RFA é a distinção entre doenças viral e bacteriana e também para reduzir o uso desnecessário de antibióticos (PYÖRÄLÄ *et al.*, 1994).

A proteína C-reativa é um útil indicador de processo inflamatório em atividade, quer seja de origem infecciosa (pneumonia, tuberculose) ou não (febre reumática em atividade, artrite reumatóide, lúpus eritematoso).

Proteína C-reativa e amilóide sérica A (proteína transportada pelas lipoproteínas de alta densidade, HDL) são consideradas as proteínas mais importantes para o diagnóstico de fase aguda. Segundo KANEKO *et al.* (1997), a proteína que tem a maior resposta em inflamações agudas no cavalo é amilóide sérica A.

A resposta inflamatória é o mecanismo fundamental pelo qual a defesa contra a injúria inicia uma série de eventos para a realização deste processo (KANEKO *et al.*, 1997).

A proteína c-reativa (PCR) está presente também, em várias outras condições patológicas como no infarto agudo do miocárdio, doenças neoplásicas, trauma intenso, viroses, queimaduras. A determinação de sua concentração sérica constitui um teste eficaz no diagnóstico e no prognóstico das inflamações (KANEKO *et al.*, 1997).

2.4.2.2. Descrição dos métodos para a dosagem de Proteína c reativa

2.4.2.2.1. Descrição do método nefelométrico

Sistema para a dosagem de proteínas séricas em fluídos biológicos. O sistema consiste de um nefelômetro para medir a razão da formação da luz dissipada resultado da reação de imunoprecipitação entre antígeno-anticorpo.

O componente central do sistema Array¹, o nefelômetro mede a intensidade de luz que é dissipada pelas partículas em suspensão quando um raio de luz passa através da célula de fluxo (leitura). Estas partículas são formadas por reação de imunoprecipitação que ocorre quando um anticorpo específico (anti-PCR, reagente) entra em contato com o antígeno (PCR, amostra). Resultando na formação de um complexo e a consequente troca na intensidade que ocorre quando a luz é dissipada, num primeiro momento ocorre um aumento gradual e no final do procedimento ocorre a formação de um pico.

A técnica é totalmente automática, após a calibração com calibrador próprio, e o equipamento pipeta o volume necessário do reagente único (anti-soro) e da amostra e os transporta para a célula de fluxo, onde ocorre a reação, antes da realização dos testes um controle de valor conhecido foi dosado e o seu resultado foi avaliado para a validação dos testes.

Quando da existência do excesso de antígeno (PCR da amostra) o equipamento processa automaticamente a sua diluição. Esta técnica é denominada de Rate Nefelometria.

O teste de PCR do sistema Array apresenta um limite inferior de sensibilidade de 0,1mg/dL (1,0mg/L). O método é linear até a concentração de 100mg/dL.

O volume do reagente recomendado pela técnica é pipetado automaticamente pelo equipamento bem como o volume de amostra.

O método nefelométrico mede o aumento da luz dissipada nas partículas suspensas na solução com resultado do complexo formado durante a reação antígeno-anticorpo.

¹ Array – Beckman Coulter Inc - USA

A quantidade de luz dissipada é diretamente proporcional à quantidade de complexos formados (MANUAL DO EQUIPAMENTO, BCI).

2.4.2.2.2. Descrição do método turbidimétrico

A reação permite quantificar, mediante um método turbidimétrico, a concentração de PCR presente na amostra. As partículas de poliestireno recobertas com anti-PCR, que funcionam como anticorpo, se mistura com a amostra formando agregados em presença de PCR da amostra que funcionam como antígeno. O processo de aglutinação que se forma provoca um aumento no tamanho das partículas e um aumento da absorvância, que é medida por comparação com o calibrador de concentração conhecida.

Utiliza 02 reagentes e 01 calibrador que deverá ser diluído antes de se colocar no equipamento. O reagente de trabalho deve ser preparado antes e uma curva de calibração com 5 pontos após diluições seriadas do calibrador que acompanha o kit, deverá ser preparada e dosada.

A sensibilidade do método é de 0,15mg/dL. Os valores de referência para humanos utilizando este método são inferiores a 6mg/dL.

2.4.2.2.3. Descrição do método aglutinação em látex

O método fundamenta-se em uma reação de aglutinação de partículas de látex recobertas com gamaglobulina anti-PCR, especialmente tratadas para evitar aglutinações inespecíficas. A aglutinação é visível em amostras com concentração de PCR igual ou superior a 6 mg/L de acordo com as referências estabelecidas pelos padrões Internacionais da OMS. A técnica é de triagem, semi-quantitativa. A avaliação do resultado é visual e os cálculos são baseados na aglutinação (INSTRUÇÕES DE USO).

2.5. Eletrólitos

2.5.1. Conceito e importância clínica

Um eletrólito é uma substância permutável que se dissocia em partículas permutáveis ou íons em solução (STEWART, 1998). Pode ser dividido em cátions (carga positiva) e ânions (carga negativa) e deve estar

em equivalência para manutenção da eletroneutralidade dentro do organismo (STEWART, 1983; DIVERS *et al.*, 1986).

A principal função dos eletrólitos no organismo animal é a manutenção das forças osmóticas, o que possibilita o equilíbrio de líquidos entre os compartimentos intra e extracelulares (TEIXEIRA *et al.*, 2003).

Cada compartimento, intra e extracelular, contém um soluto principal, sendo este responsável pela manutenção da osmolalidade nesse espaço. A osmolalidade se traduz pela quantidade total de partículas dissolvidas em uma solução (BROWNLOW e HUTCHINS, 1982). As inter-relações entre eletrólitos, proteínas e o equilíbrio ácido-base podem ser muito importantes no auxílio na decisão da terapêutica (STAMPFLI e CARLSON, 2001).

Essa diferença de constituição entre o espaço intra e o extracelular é mantida pela permeabilidade seletiva da membrana celular e pela atividade da bomba de sódio-potássio (BENESI e KOGIKA, 1999), que promovem um constante movimento de água entre esses compartimentos, devido ao gradiente osmótico estabelecido entre os dois lados da membrana celular (ROSE, 1981; DEARO e REICHMANN, 2001). A pressão osmótica é a força motora que promove a movimentação da água entre os dois compartimentos, intra e extracelular, sendo esta movimentação totalmente passiva (TASKER, 1997; RANDALL *et al.*, 2000; COSTA, 2003).

Na célula, os eletrólitos atuam na condução nervosa e despolarização de fibras musculares, tornando possível a contração muscular. A extensão na qual essas funções podem ser prejudicadas em um dado déficit de eletrólitos induzido pelo exercício e na qual a capacidade atlética pode ser reduzida já pode ser verificada (TEIXEIRA *et al.*, 2003).

Concentrações anormais de eletrólitos no plasma como cálcio, potássio e sódio podem desencadear distúrbios eletrolíticos associados com quadros de diarreia, doença renal, baixo desempenho atlético e sudorese (ROSE e HODGSON, 1994).

O sódio e o potássio são os principais solutos extra e intracelular, respectivamente (JOHNSON, 1995). O sódio, potássio e cloretos são extremamente importantes por causa de suas altas concentrações e, por estarem completamente dissociados em soluções aquosas, as determinações de suas concentrações relativas são os principais

determinantes para o equilíbrio ácido-base (STAMMPFLI e CARLSON, 2001).

A melhor informação sobre o grau de desidratação e a necessidade de reposição hidroeletrólítica é obtida por meio de exame físico (DE MORAIS e DI BARTOLA, 1993; FREESTONE, 1993; TAYLOR e HILLYER, 1997). Por meio do exame físico do animal, obtêm-se dados de frequência cardíaca e respiratória (TAYLOR e HILLYER, 1997; ECKE *et al.*, 1998; COLLATOS e MORRIS, 1999), coloração das mucosas, turgor da pele, tempo de enchimento capilar (FREESTONE, 1993; TAYLOR e HILLYER, 1997; ECKE *et al.*, 1998; COLLATOS e MORRIS, 1999), distensibilidade da veia jugular, qualidade do pulso arterial (FREESTONE, 1993; TAYLOR e HILLYER, 1997), motilidade intestinal e temperatura corporal (TAYLOR e HILLYER, 1997; ECKE *et al.*, 1998).

2.5.1.1. Sódio (Na⁺)

2.5.1.1.1. Conceito e importância clínica

O íon sódio é o principal cátion do líquido extracelular e um importante componente do esqueleto. Cerca de 50% do depósito corporal de sódio é encontrado no líquido extracelular, 45% nos ossos e o restante no interior das células. As principais funções do íon sódio são: regulação da pressão osmótica de cristalóides, equilíbrio ácido-base, manutenção dos potenciais de membrana, transmissão de impulsos nervosos e processos de absorção de monossacarídeos, amino ácidos, pirimidinas e sais biliares (MICHELL, 1983; SWENSON e REECE, 1996).

A concentração plasmática de sódio reflete a razão entre a composição corporal total de sódio e a quantidade total de água. Logo, a determinação da concentração de sódio auxilia na avaliação do grau de hidratação dos equinos. A diminuição da concentração plasmática de sódio (hiponatremia) em equinos desidratados indica perda de fluido hipertônico, ou seja, que houve maior perda de sódio do que de água. Já o aumento nessa concentração (hipernatremia) caracteriza perda de fluido hipotônico, ou seja, água livre, provavelmente por privação de ingestão de água (STOCKHAM e SCOTT, 1995).

2.5.1.1.2. Descrição dos métodos para a determinação de sódio

2.5.1.1.2.1. Descrição do método de Fotometria de chama

Os metais alcalinos, quando elevados a uma temperatura suficientemente alta, absorvem energia da fonte de calor e passam ao estado de excitação em sua forma atômica. Quando estes átomos “esfriam”, eles voltam ao estado normal não excitado e reemitem sua energia absorvida por radiação com comprimentos de onda específicos, alguns dos quais na região do visível da luz, para o Sódio o comprimento de onda é de 589 nm . Um metal alcalino aspirado por uma chama de baixa temperatura em um fotômetro de chama, na forma nebulizada vai, depois de excitado pela chama, emitir uma onda de frequência discreta, a qual pode ser isolada por um filtro óptico. A emissão é proporcional ao número de átomos excitados e, portanto, a concentração do íon na amostra.

O reagente que constitui o padrão é uma solução que contém sódio na concentração de 140mmol/L (mEq/L) e potássio na concentração de 5,0 mmol/L (5mEq/L).

O padrão é diluído 1:50 em água destilada, assim como as amostras, e o equipamento é zerado contra água destilada, a mesma utilizada na diluição. O Equipamento deve ser calibrado com o padrão diluído 1:50. O equipamento deve ser calibrado após a dosagem de 5 amostras.

O valor obtido na dosagem é multiplicado pelo fator 2.

2.5.1.1.2.2. Descrição do método de íon eletrodo seletivo

Método que utiliza membranas para as dosagens de íons, onde um eletrodo é selecionado e é específico para determinado íon. É mais automática que a da fotometria de chama, só que não requer chama para a determinação do íon, o mesmo se fixa na membrana do eletrodo, existe um eletrodo específico para cada parâmetro. Os padrões utilizados são similares àqueles utilizados na fotometria de chama. A sistemática de pipetagem é a mesma da fotometria de chama.

2.5.1.1.3. Metabolismo de sódio

O sódio é o principal cátion do fluído extracelular (FEC); é um fator necessário para algumas reações metabólicas, mas atua predominantemente como indutor oculto na maioria das transferências de fluidos pelas superfícies epteliais do organismo. O transporte primário de sódio pode propiciar a força eletromotora necessária à movimentação de ânions pareados ou ao gradiente osmótico, para a transferência de água entre os compartimentos. Vários mecanismos de difusão facilitada de moléculas orgânicas dependem, em parte, do transporte de sódio. O influxo controlado de sódio pela membrana celular é a base para a propagação de todas as alterações do potencial de ação do organismo; por isso, ele resulta em impulsos nervosos, contrações musculares e vários eventos em células secretoras. O conteúdo corporal de sódio é determinado pelo equilíbrio entre a ingestão do mineral na dieta e sua excreção na urina, nas fezes e no suor. A manutenção do equilíbrio de sódio deve-se principalmente aos efeitos do mecanismo renina-angistensina-aldosterona no transporte de sódio pelas superfícies epteliais dos rins, no sistema gastrintestinal e nas glândulas sudoríparas (BAKER *et al.*, 2007).

2.5.1.2. Potássio (K⁺)

2.5.1.2.1. Conceito e importância clínica

O potássio em sua forma iônica é o principal cátion do líquido intracelular e 89% do seu conteúdo corporal total estão localizados dentro das células (MICHELL, 1983; SWENSON e REECE, 1996).

Os equinos apresentam valores elevados de potássio e a hipercalemia pode ocorrer devido à diminuição na secreção renal, por um deslocamento de potássio do meio intra para o extracelular (observado na acidemia), ou devido à coleta imprópria da amostra ou se esta se torna hemolisada. A hemólise *in vivo* geralmente não causa hipercalemia, a menos que haja diminuição acentuada da taxa de filtração glomerular (ROSE, 1981; DIVERS *et al.*, 1986; STOCKHAM, 1995).

Já a diminuição da concentração de potássio (hipocalemia) é observada em enfermidades nas quais ele é excessivamente eliminado pelo

organismo, como nos distúrbios renais e intestinais, ou por perda excessiva pelo suor. A hipocalcemia também ocorre por sequestro do potássio para o meio intracelular, observada na alcalose sanguínea ou alcalemia (ROSE, 1981; STOCKHAM, 1995).

2.5.1.2.2. Descrição dos métodos para dosagem de potássio (K^+)

2.5.1.2.2.1. Descrição do método de fotometria de chama

Os metais alcalinos, quando elevados a uma temperatura suficientemente alta, absorvem energia da fonte de calor e passam ao estado de excitação em sua forma atômica. Quando estes átomos “esfriam”, eles voltam ao estado normal não excitado e reemitem sua energia absorvida por radiação com comprimentos de onda específicos, alguns dos quais na região do visível da luz, para o Sódio o comprimento de onda é de 589 nm . Um metal alcalino aspirado por uma chama de baixa temperatura em um fotômetro de chama, na forma nebulizada vai, depois de excitado pela chama, emitir uma onda de frequência discreta, a qual pode ser isolada por um filtro óptico. A emissão é proporcional ao número de átomos excitados e, portanto, a concentração do íon na amostra.

O reagente que constitui o padrão é uma solução que contém sódio na concentração de 140mmol/L (mEq/L) e potássio na concentração de 5,0 mmol/L (5mEq/L).

O padrão é diluído 1:50 em água destilada, assim como as amostras, e o equipamento é zerado contra água destilada, a mesma utilizada na diluição. O Equipamento deve ser calibrado com o padrão diluído 1:50. O equipamento deve ser calibrado após a dosagem de 5 amostras.

O valor obtido na dosagem é multiplicado pelo fator 2.

2.5.1.2.2.2. Descrição do método íon eletrodo seletivo

Método que utiliza membranas para as dosagens de íons, onde um eletrodo é selecionado e é específico para determinado íon. É mais automática que a da Fotometria de chama, só que não requer chama para a determinação do íon, o mesmo se fixa na membrana do eletrodo, existe um eletrodo específico para cada parâmetro. Os padrões utilizados são similares

àqueles utilizados na fotometria de chama. A sistemática de pipetagem é a mesma da fotometria de chama.

2.5.1.2.3. Metabolismo de potássio

É o principal cátion no fluido intracelular (FIC) e do organismo. Sua distribuição pelas membranas celulares, entre os compartimentos FIC e FEC, é o principal determinante do potencial de membrana celular em repouso. A rápida entrada de sódio nas células caracteriza as alterações do potencial elétrico, necessárias para a comunicação entre as várias células, mas a distribuição de potássio repolariza a membrana após o evento do potencial de ação. O potássio é muito importante para a manutenção do ritmo e da frequência cardíaca normais, o controle renal de sódio, o metabolismo ácido-básico e vários processos do metabolismo intermediário (BAKER *et al.*, 2007).

2.5.1.3. Cloreto (Cl⁻)

2.5.1.3.1. Conceito e importância clínica

O cloreto é essencial para a vida, ele desenvolve o principal papel na manutenção da neutralidade eletroquímica do líquido extra-celular, incluindo o plasma .

O cloreto é o principal ânion do espaço extracelular, pois sua concentração plasmática possui uma estreita relação com as concentrações de sódio e bicarbonato (ROSE, 1981; TAYLOR e HILLYER, 1997). As alterações nas concentrações de cloreto normalmente estão relacionadas às alterações de sódio e bicarbonato. Existe uma correlação negativa entre as concentrações de cloreto e bicarbonato e uma correlação positiva do sódio com o cloreto (LUNA, 1994), com a finalidade de se manter o equilíbrio de cargas elétricas dentro do organismo (ROSE, 1981; LUNA, 1994; TAYLOR e HILLYER, 1997).

Os íons cloretos têm importante papel na manutenção e distribuição de água, no balanço aniônico e catiônico do líquido extracelular (LEC) e na pressão osmótica.

Os íons sódio e cloreto são os principais responsáveis pela osmolalidade plasmática; como o cloreto não se liga ao íon hidrogênio em pH fisiológico, não atua como tampão. Para manter a neutralidade eletroquímica, o cloreto varia inversamente com o bicarbonato (MEYER e HARVEY, 1998).

O cloreto, juntamente com o sódio, é responsável pelo equilíbrio ácido-base e pela manutenção da pressão osmótica (GONZÁLEZ e SILVA, 2003). A hiperclorêmia é associada com a desidratação e com a acidose tubular renal, ao passo que a hipoclorêmia ocorre em acidose metabólica (MEYER e HARVEY, 1998).

A hipoclorêmia é observada nos vômitos com perda de ácido clorídrico (HCl) e nos estados acidóticos nos quais existe um acúmulo de ânions orgânicos (Ânion gap positivo). A verdadeira hipoclorêmia é um componente frequente das alcaloses metabólicas persistentes associadas à pressão de volume (COLES, 1984; KANEKO *et al.*, 1997).

A hiperclorêmia ocorre em várias formas de acidose metabólica incluindo aquelas secundárias à perda de grande quantidade de bicarbonato, como nas diarreias prolongadas e nas ureteroenterostomias. Também gamopatias mono e policlonais estão associadas com hiperclorêmia. Tem-se demonstrado a presença de concentrações elevadas do cloreto sérico em pacientes com hiperparatireoidismo. Também na síndrome nefrótica encontra-se a hiperclorêmia. A acidose tubular renal é uma condição hiperclorêmica (COLES, 1984; KANEKO *et al.*, 1997).

2.5.1.3.1. Descrição dos métodos para a determinação cloretos (Cl)

2.5.1.3.2.1. Descrição do método colorimétrico

Método para a determinação de cloretos, teste colorimétrico. Em presença de íons cloreto, o tiocianato de mercúrio, em meio ácido, forma cloreto mercurico e íons tiocianato. Esses reagem com os íons férricos formando tiocianato férrico de cor amarelo-laranja que é proporcional à concentração de cloretos da amostra (LIMA *et al.*, 1985).

2.5.1.3.2.2. Descrição do método titulométrico

Os íons cloretos são titulados com uma solução de nitrato de mercúrio, usando como indicador a difenilcarbazona. Os íons Hg^{+2} reagem com os íons cloreto (Cl^-) formando o cloreto de mercúrio, que é praticamente indissociável, porém solúvel. O excesso de Hg^{+2} reage com a difenilcarbazona, formando um complexo de cor azul violeta no ponto final da titulação (LIMA *et al.*, 1985).

2.5.1.3.2.3. Descrição do método colorimétrico

Íons cloretos presentes na amostra reagem com o tiocianato de mercúrio formando cloreto de mercúrio e íons tiocianato. Esses quando combinados aos íons férricos formam tiocianato férrico, de coloração amarela com a intensidade proporcional à concentração de cloretos (LIMA *et al.*, 1985).

2.5.1.3.3. Metabolismo de cloretos

O cloreto é o principal ânion do FEC (fluido extracelular), atua principalmente no mecanismo de transporte que envolve o equilíbrio entre água e cátion e como um ânion conjugado no metabolismo ácido-básico. Como sua movimentação está associada ao transporte de outros íons, o cloreto é fundamental para a produção de fluido cérebro espinhal, absorção de eletrólitos na alça de Henle e absorção e secreção de eletrólitos e fluidos no trato gastrintestinal. Em geral, seu metabolismo é controlado secundariamente pelo metabolismo de sódio; no entanto, o cloreto é um nutriente essencial, cuja importância muitas vezes é negligenciada (BAKER *et al.*, 2007).

2.5.1.4. Cálcio (Ca^{+2})

2.5.1.4.1. Conceito e importância clínica

No plasma, o cálcio (Ca) existe em duas formas, livre ionizada (cerca de 50%) ou associado a moléculas orgânicas, tais como proteínas, principalmente albumina (cerca de 45%) ou ácidos orgânicos (cerca de

10%). O cálcio total, forma como é medido no sangue, contém a forma ionizada, que é biologicamente ativa, e a forma não ionizada. Estas duas formas estão em equilíbrio e sua distribuição final depende do pH, da concentração de albumina e da relação ácido-base. Quando existe acidose, há uma tendência para aumentar a forma ionizada de Ca. A queda na concentração de albumina causa diminuição no valor do cálcio sanguíneo. O sistema endócrino envolvendo a vitamina D3, o paratormônio (PTH) e a calcitonina, responsáveis pela manutenção dos níveis sanguíneos de cálcio, atua de forma bastante eficiente para ajustar-se à quantidade de cálcio disponível no alimento às perdas que acontecem principalmente na gestação e lactação. O firme controle endócrino do Ca faz com que os níveis variem muito pouco (17%) comparado com o fósforo (variação de 40%) e o magnésio (variação de 57%). Portanto o nível sanguíneo de cálcio não é bom indicador do estado nutricional, enquanto que os níveis de fósforo e magnésio refletem diretamente o estado nutricional com a relação a estes minerais (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

2.5.1.4.2. Cálcio total (Ca) e cálcio ionizado (Ca^{2+})

2.5.1.4.2.1. Conceito e importância clínica

O cálcio ionizado (Ca^{+2}) é a fração mais importante do ponto de vista biológico, representando cerca de 50% do cálcio total, pois desempenha a função do íon regulador em muitos processos metabólicos (DUNCAN e PRASSE, 1982).

Em algumas condições mórbidas, como nos pacientes acometidos por alguns tipos de neoplasias ou em estágio final da doença renal, nas quais pode ocorrer alteração na proporção das frações do cálcio, somente a mensuração do cálcio ionizado pode fornecer uma avaliação precisa da fração do cálcio biologicamente ativa.

Vários fatores podem influenciar a proporção da fração do cálcio ionizado, sendo os mais importantes a concentração de proteínas séricas e albumina, o pH do sangue e a temperatura corporal (SENA e BOERS, 1988).

Na tentativa de estimar o grau de interferência desses fatores na avaliação de laboratório do cálcio, foram desenvolvidas fórmulas de

correção, sendo a mais utilizada a que considera a concentração sérica de albumina na correção do valor do cálcio total. Nenhuma fórmula mostrou-se totalmente eficaz para estimar, de forma adequada, a concentração sérica do cálcio ionizado.

O cálcio está aumentado na neoplasia, na intoxicação com vitamina D, no hiperparatireoidismo primário e na dieta com excesso de cálcio (GONZÁLES e SCHEFFER, 2002).

O cálcio está diminuído na febre do leite (vacas leiteiras), na deficiência de vitamina D, no hipoparatiroidismo, na hipoalbuminemia, em doença renal crônica, em animais velhos, na gestação e lactação, nas doenças intestinais, em dieta com baixo nível de cálcio ou dieta com baixa ou excesso de magnésio (GONZÁLES e SCHEFFER, 2002).

2.5.1.4.3. Descrição dos métodos para a dosagem de Cálcio total (tCa)

2.5.1.4.3.1. Descrição do método cálcio arsenazo III Bioclin

Determinação quantitativa do cálcio em amostra de soro, plasma e urina através de reação colorimétrica. Aplicação manual e automática. Colorimétrica de ponto final (arsenazo III). O cálcio reage em meio ácido formando o complexo de coloração azul, cuja intensidade é proporcional à concentração de cálcio na amostra. A absorvância do produto da reação deve ser medida nos comprimentos de onda entre 600 e 680nm.

2.5.1.4.3.2. Descrição do método de cresolftaleína

Em pH alcalino o cálcio reage com a cresolftaleína complexona formando um complexo molecular de cor púrpura, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração do Cálcio presente na amostra e possui absorção máxima em 570 nm.

2.5.1.4.4. Metabolismo de cálcio

Além de sua importante função estrutural no sistema esquelético, o cálcio desempenha várias funções relacionadas ao controle da entrada de íons através das membranas celulares e a ativação das funções secretoras e de contração celular, é um co-fator em reações metabólicas intermediárias.

Os sinais mais críticos do desequilíbrio de cálcio envolvem principalmente a transmissão de estímulos nervosos sinápticos, a contração do músculo esquelético e a função do músculo cardiovascular.

Cerca de 50% do cálcio total do sangue estão ligados às proteínas plasmáticas (principalmente albumina), menos de 10% está nos complexos minerais ligados aos fosfatos inorgânicos e o restante permanece em sua forma ionizada. Há uma relação entre o produto de solubilidade dependente do pH (potencial Hidrogenionte) do cálcio e fósforo; desse modo a ionização relativa do cálcio no sangue depende do pH. Na acidose, maior quantidade de prótons compete com os íons cálcio (e com outros cátions) na ligação aos locais aniônicos das proteínas plasmáticas, como albumina. Isso aumenta o conteúdo de cálcio ligado às proteínas na solução, elevando o teor de cálcio ionizado. Por outro lado, a alcalose diminui o teor de cálcio ionizado.

Um aspecto importante da interação cálcio-proteína refere-se a influência da concentração de albumina no teor de cálcio total do sangue. Os analisadores químicos automáticos convencionais determinam a concentração de cálcio total no plasma. Geralmente, o teor de cálcio ionizado é obtido por um teste especial em analisador específico (módulo ISE ou íon eletrodo seletivo), a partir do perfil bioquímico de rotina. Desse modo, as alterações na concentração de albumina podem ter efeitos significativos nos teores de cálcio obtidos no painel de diagnóstico padrão.

A utilização de fórmulas para o cálculo teórico do cálcio ionizado ainda carece de validação, pois, a sua confiabilidade acontece quando em condições de equilíbrio ácido-básico relativamente normal.

Distúrbios acidobásicos também alteram o metabolismo de cálcio em vias previsíveis. Acidose aumenta a ionização de cálcio e promove a desmineralização óssea e estimula os efeitos do PTH (paratormônio) para a liberação de cálcio, mas inibe seus efeitos na reabsorção renal de cálcio. A acidose apresenta forte tendência para provocar a perda de cálcio no organismo (BAKER *et al.*, 2007).

2.5.1.5. Magnésio (Mg²⁺)

2.5.1.5.1. Conceito e importância clínica

O magnésio, íon intracelular, exerce amplo papel no organismo animal, por ser ativador de muitas enzimas envolvidas em processos ligados ao metabolismo energético, ao metabolismo dos ácidos nucleicos e à biossíntese de proteínas, tendo importância também na contração muscular e na neurotransmissão. É particularmente necessário como catalisador para muitas reações enzimáticas intracelulares, sobretudo as relacionadas com o metabolismo dos carboidratos (GUYTON e HALL, 2002).

O aumento das concentrações extracelulares de magnésio deprime a atividade do sistema nervoso, bem como a contração do músculo esquelético (GUYTON e HALL, 2002). Segundo RIBEIRO FILHO (2003), a hipermagnesemia pode ocorrer devido à desidratação e ao desequilíbrio ácido-base. Já a hipomagnesemia é observada na acidose metabólica (ZALOGA *et al.*, 1987).

A hipomagnesemia ou a tetania hipomagnesêmica constitui uma doença da produção, geralmente causada pela baixa ingestão de magnésio na dieta. Pode causar, além da tetania, hiperexcitabilidade (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

Níveis de magnésio diminuídos no plasma estão associados com a tetania, fraqueza, desorientação e sonolência, que refletem a deficiência do magnésio ionizado (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

Não existe um controle homeostático rigoroso do magnésio e, portanto, sua concentração sanguínea reflete diretamente o nível da dieta. O controle renal de magnésio está mais direcionado para prevenir a hipermagnesemia, mediante a excreção do excesso de magnésio pela urina. Diante de uma deficiência de magnésio, seus níveis na urina caem praticamente a zero. Assim, os níveis de magnésio na urina são indicadores da ingestão do mineral nos alimentos (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

2.5.1.5.2. Descrição dos métodos para a determinação de magnésio

2.5.1.5.2.1. Descrição do método Mann e Yoe de

Método colorimétrico de ponto final, o corante de Mann e Yoe, em pH alcalino e em presença de magnésio desenvolve coloração vermelha. A intensidade de cor vermelha do complexo é proporcional à concentração de magnésio.

2.5.1.5.2.2. Descrição do método automação

Magnésio automação. Os íons magnésio em meio alcalino formam um complexo colorido (vermelho) com o azul de xilidila. O aumento de absorvância é proporcional à concentração de magnésio na amostra.

2.5.1.5.2.3. Descrição do método magon sulfonado

Reação de ponto final. Os íons magnésio reagem com o magon sulfonado (cor azul) em meio alcalino formando um complexo cor rósea que é proporcional à quantidade de íons magnésio na amostra.

2.5.1.5.3. Metabolismo de magnésio

O magnésio atua como co-fator de várias enzimas importantes no metabolismo intermediário, mas talvez seja mais conhecido por sua função facilitadora da atividade normal da enzima Na/K ATP-ase nas membranas celulares de todo o organismo. O magnésio é útil em algumas funções estruturais no mecanismo de formação dos ossos; pode, ainda, controlar a liberação de PTH (Paratormônio) pelas glândulas paratireóides. Ele também influencia as propriedades da membrana celular, fundamentais para a condução nervosa, atividade dos canais de cálcio e transporte de fósforo. O controle de magnésio pelo corpo é muito semelhante ao de potássio, assim é possível que distúrbios que causem hipo ou hipercalemia provoquem hipo ou hipermagnesemia (BAKER *et al.*, 2007).

2.6. Carboidratos

2.6.1. Glicose

2.6.1.1. Conceitos, importância clínica e metabolismo

O carboidrato na forma de glicose é a principal fonte de energia para os principais processos para a vida nas células dos mamíferos (KANEKO *et al.*, 1997).

A glicose é um monossacarídeo composto de seis átomos de carbono e pode ser considerado o mais abundante na natureza (LEHNINGER, 1995). Esse monossacarídeo é a primeira fonte de energia para todas as células dos mamíferos (KLEIN *et al.*, 2002), sendo o carboidrato característico do sangue e de outros líquidos tissulares (BEITZ, 1996). A glicose pode ser rapidamente mobilizada dos estoques de glicogênio, quando ocorrem demandas súbitas de energia (LEHNINGER, 1986) e constitui a via final comum para o metabolismo de quase todos os carboidratos até as células teciduais (GUYTON e HALL, 2002).

O organismo precisa de glicose para o sistema nervoso, tecido adiposo, músculo, feto e glândula mamária (BERGMAN, 1996). A glicose no sangue e em determinados líquidos tissulares é removida por todas as células do organismo para produzir energia útil ou trifosfato de adenosina (ATP), sendo o único combustível consumido pelo sistema nervoso central, sob condições normais (CUNNINGHAM, 2002).

Entre os vários metabólitos usados como combustível para a oxidação respiratória, a glicose é considerada o mais importante, sendo vital para as funções, tais como, o metabolismo do cérebro e na lactação. O nível de glicose sanguínea pode indicar falhas na homeostase, como ocorre em doenças como cetoses. O teor de glicose sanguínea tem poucas variações, em função dos mecanismos homeostáticos bastante eficientes do organismo, os quais envolvem o controle endócrino por parte da insulina e do glucagon sobre o glicogênio e dos glicocorticóides sobre a gliconeogênese. Quando o fornecimento energético é inadequado, esses hormônios estimulam a degradação do glicogênio hepático e a síntese de nova glicose no fígado e quando o balanço energético se torna negativo,

estimulam a mobilização de triglicerídeos para fornecer ácidos graxos como fonte de energia e glicerol como precursor da glicose hepática (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

O conjunto de mecanismos bioquímicos pelos quais a energia química contida nos alimentos fica disponível para o animal é denominado metabolismo e acompanha os eventos bioquímicos que ocorrem do momento da ingestão até a quebra final e excreção. A função mais importante dos carboidratos ingeridos é a de servir como fonte de energia e a menos importante é servir como armazenamento (KANEKO *et al.*, 1997).

Cavalos subalimentados apresentam com freqüência a hipoglicemia e a hiperlipemia. A mobilização dos lipídios nesta espécie pode ser excessiva podendo causar dano hepático, às vezes fatal (GONZÁLES e SCHEFFER, 2002).

A digestão e absorção dos carboidratos iniciam-se com contato preliminar do alimento com enzimas da secreção salivar. No estômago, há pouca digestão de carboidratos, exceto por uma pequena fase de hidrólise ácida. Entretanto a digestão destes compostos é extensa no intestino delgado, primariamente como resultado da atividade das enzimas digestoras de carboidratos (COLES, 1984).

A maior forma de armazenamento de glicose nos animais é o glicogênio e é análogo ao armazenamento de amido nos vegetais (KANEKO *et al.*, 1997). A liberação de glicose para a corrente sanguínea também passa pela quebra do glicogênio hepático (KANEKO *et al.*, 1997).

A hiperglicemia pode ser causada por um desequilíbrio entre a liberação hepática da glicose e a absorção periférica do açúcar, ocorrendo provavelmente no diabetes melitus (COLES, 1984), enquanto a hipoglicemia é mais comum em períodos de jejum prolongado (MEYER *et al.*, 1995).

A hiperglicemia pode estar presente em: diabetes melitus, hiperadrenocorticism, stress, pancreatite, hipoinsulinismo, alimentação recente, deficiência de tiamina, animais jovens e infusão intravenosa de glicose (GONZÁLEZ e SILVA, 2007).

A hipoglicemia está presente: hiperinsulinismo, hipoadrenocorticism, síndrome da mal absorção, amostras mal conservadas, subnutrição, na lactação e na toxemia da gestação (ovelhas) (GONZÁLEZ e SILVA, 2007).

2.6.1.2. Descrição dos métodos para a determinação de glicose

A determinação da glicose por métodos enzimáticos combina a elevada especificidade de ação das enzimas com a simplicidade operacional envolvida. O método proposto é facilmente automatizável, adaptando-se a todos os analisadores automáticos disponíveis.

No presente método, a glicose da amostra sofre a ação da glicose oxidase em presença de oxigênio produzindo peróxido de hidrogênio; este, em presença de fenol e de 4-aminoantipirina, sofre a ação da peroxidase produzindo um composto róseo-avermelhado (quinonimina) com máximo de absorção em 505 nm.

2.7. Bilirrubina

2.7.1. Conceito e importância clínica

A maior parte da bilirrubina do plasma deriva da degradação dos eritrócitos velhos pelo sistema retículo-endotelial, especialmente no baço. A bilirrubina restante tem origem na degradação da mioglobina, dos citocromos e de eritrócitos imaturos na medula óssea. A hemoglobina liberada dos eritrócitos se divide em porção globina e grupo heme. Após a extração da molécula de ferro, que fica armazenado ou é reutilizado, o grupo heme é convertido em bilirrubina. A bilirrubina assim formada é chamada de bilirrubina livre, que é transportada até o fígado ligada à albumina plasmática. Esta forma, também conhecida como bilirrubina indireta, não é solúvel em água. Sendo lipossolúvel, não é filtrada pelos glomérulos renais, e não é excretada pela urina (EADES e BOUNOUW, 1997; GONZÁLEZ e SILVA, 2007).

No fígado, a bilirrubina é desligada da albumina e conjugada com ácido glucorônico para formar a bilirrubina conjugada. Esta é solúvel em água e secretada ativamente pelos canalículos biliares menores e posteriormente excretada pela bile. A bilirrubina conjugada não pode ser absorvida no intestino, mas as enzimas bacterianas presentes no íleo e colon convertem a bilirrubina em urobilinogênio fecal (estercobilinogênio),

que é reabsorvido em torno de 10% a 15% pela circulação portal até o fígado. A maioria deste urobilinogênio é re-excretada pela bile e uma parte pode ser excretada pela urina. O urobilinogênio não reabsorvido no intestino é oxidado a estercobilina, pigmento responsável pela cor marrom das fezes. (GONZÁLEZ *et al.*, 2002).

A bilirrubina é o principal pigmento biliar encontrado no soro dos animais domésticos (COLES, 1984).

No plasma, são observadas pequenas quantidades de bilirrubina conjugada, sendo a maior parte da bilirrubina plasmática do tipo livre (indireta) (EADES e BOUNOUW, 1997; GONZÁLEZ e SILVA, 2007).

2.7.1.1 Bilirrubina total

2.7.1.1.1. Conceito e importância Clínica

O aumento dos níveis plasmáticos de bilirrubina pode ser devido ao aumento da bilirrubina livre que ocorre na hemólise aguda grave, na absorção de um grande hematoma, na hemorragia interna massiva ou na transfusão de eritrócitos armazenados inadequadamente. O aumento da bilirrubina conjugada ocorre na perda da funcionalidade hepato-celular, devido a doença infecciosa, dano tóxico ou obstrução do trato biliar. O aumento simultâneo da bilirrubina livre e da conjugada ocorre na perda da funcionalidade hepato-celular, na obstrução do fluxo biliar ou após uma hemólise intravascular aguda grave (GONZÁLEZ e SILVA, 2007).

Diminuições dos níveis plasmáticos de bilirrubina são observadas em doenças crônicas, principalmente as que cursam com diminuição da formação dos eritrócitos, causando anemia. Portanto, a hipobilirrubinemia é devido a anemias hipoproliferativas (arregenetativas) atribuídas a uma infecção ou inflamação crônica, à neoplasia maligna ou na última fase da enfermidade renal (GONZÁLEZ e SILVA, 2007).

Nos equinos, um fenômeno fisiológico causa um problema na interpretação das bilirrubinas. A anorexia ou o jejum por 24 horas ou mais pode resultar em icterícia, que é causada, em parte, pelos metabólitos (como ácidos biliares) (KANEKO *et al.*, 1997).

A bilirrubina é sensível à luz, e a exposição direta à luz solar por 1 hora pode reduzir o nível de bilirrubina de uma amostra em até 50%. (HENDRIX, 2005).

2.7.1.1.2. Descrição dos métodos para a bilirrubina total

A bilirrubina reage com o sal de diazônio do ácido sulfanílico formando um produto de acoplamento vermelho com máximo de absorção em 525 nm. A bilirrubina indireta (ligada à albumina) e a bilirrubina direta (ligada ao ácido glucorônico) são dosadas após a ação solubilizante e catalisadora da mistura cafeína/benzoato de sódio. Por outro lado, a bilirrubina direta pode ser especificamente determinada em meio aquoso, sem a necessidade de solubilização ou catálise. A bilirrubina indireta pode ser determinada, portanto, por diferença.

2.7.2. Metabolismo de bilirrubina

A bilirrubina é um subproduto do metabolismo da hemoglobina e, em menor grau, do metabolismo de outros compostos que contêm porfirina (mioglobina, citocromo P₄₅₀, peroxidase e catalase). As hemácias velhas costumam ser destruídas em uma taxa constante: contudo nas doenças hemolíticas essa taxa de destruição é maior. As hemácias senescentes, que atingiram o final de sua meia-vida, são fagocitadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear. Isso ocorre principalmente no baço e também no fígado e na medula óssea. Essas hemácias fagocitadas são destruídas e a hemoglobina metabolizada. A porção globina da molécula de hemoglobina é transformada em amino ácidos, enquanto a porção heme origina ferro e protoporfirina. O ferro é reciclado, mas a protoporfirina é transformada inicialmente em biliverdina e, em seguida, em bilirrubina. Essa bilirrubina é liberada dos macrófagos e transportada ao fígado por uma proteína portadora (albumina, globulina ou outras), onde a deixa e penetra nos hepatócitos. A passagem pela membrana dos hepatócitos é facilitada por um portador, cuja capacidade pode ser saturada quando houver conteúdo muito elevado de bilirrubina no fígado. Em condição normal não há saturação, mas pode haver em caso de hemólise intensa.

A bilirrubina transportada aos hepatócitos se une a uma proteína de ligação, denominada, ligandina, que evita o refluxo de bilirrubina dos hepatócitos para o sangue e, portanto, influencia sua absorção. Os ácidos graxos livres competem com a bilirrubina pelos locais de ligação com a ligandina. No hepatócito, a bilirrubina é conjugada com grupos de açúcar. Em vários mamíferos, o principal grupo de açúcar com o qual a bilirrubina conjuga é o ácido glucorônico; isso resulta na formação de glicuronídeo de bilirrubina. Essa reação é catalisada pela enzima de membrana conhecida como uridina difosfoglicuronosida glicuronosiltransferase. Tanto os monoglicuronídeos quanto os diglicuronídeos são formados nos mamíferos, sendo os últimos a forma predominante de bilirrubina conjugada na bile. Em algumas espécies, além dos glicuronídeos, são produzidos outros conjugados (glicosídeos, conjugados mistos de glicosídeo e glicuronídeo, xilosídeos). A maior parte da bilirrubina conjugada é secretada nos canalículos biliares e excretada na bile. No entanto, essa forma de bilirrubina não é ligada à proteína, sendo mais hidrossolúvel do que a bilirrubina não conjugada, que se liga à proteína. Em geral, uma pequena parte da bilirrubina conjugada nos hepatócitos passa pelos sinusóides de sua membrana e volta ao sangue. Caso essa bilirrubina conjugada permaneça não ligada à proteína, ela é rapidamente excretada pelos rins por meio de filtração glomerular. Uma parte da bilirrubina conjugada no sangue se liga à proteína, sendo denominada biliproteína ou bilirrubina delta. Essa forma de bilirrubina conjugada não atravessa a membrana glomerular e permanece no sangue por tempo maior.

Considerando os mecanismos mencionados, é possível observar dois tipos de bilirrubina no sangue: bilirrubina conjugada e bilirrubina não-conjugada. Vários termos são atualizados para descrever estes dois tipos de bilirrubina.

A bilirrubina conjugada secretada nos canalículos biliares é excretada com a bile no intestino delgado, onde é transformada em urobilinogênio por meio de redução bacteriana. Cerca de 90% do urobilinogênio são excretados com as fezes na forma de estercobilinogênio. O restante do urobilinogênio (10%) é reabsorvido e atinge a corrente sanguínea. Parte desse urobilinogênio é removida do sangue pelos hepatócitos e novamente

excretada; outra parte circula pelos rins, atravessa a membrana glomerular e é excretada na urina (BAKER *et al.*, 2007).

2.8. Substâncias nitrogenadas

A avaliação da função renal geralmente é feita pela dosagem de uréia e creatinina (FINCO, 1997).

2.8.1. Uréia

2.8.1.1. Conceito e importância clínica

A uréia é sintetizada no fígado à partir da amônia proveniente do catabolismo de amino ácidos. Os níveis de ureia são analisados em relação ao nível de proteína na dieta e ao funcionamento renal. A uréia é excretada principalmente pela urina e, em menor grau, pelo intestino. Na maioria dos animais, o nível de uréia é indicador de funcionamento renal (GONZÁLEZ *et al.*, 2002).

A uréia no seu ciclo incorpora duas moléculas de amônia, cuja principal fonte provém do catabolismo protéico (FINCO, 1997). Sua dosagem deve ser realizada sempre que houver suspeita de redução do funcionamento renal (COLES, 1984).

As mudanças nas concentrações da uréia no sangue podem ocorrer devido à dieta do animal, às alterações no fígado e nas funções renais e à mudança na taxa do catabolismo da proteína (FINCO, 1997).

O aumento plasmático da uréia pode ser por causas pré-renais, que antecede a filtração ou por causas pós-renais, como na obstrução urinária. A concentração de uréia está aumentada na falha cardíaca, no choque hipovolêmico, na hipotensão, na desidratação e nas doenças renais (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

A diminuição plasmática da uréia ocorre em insuficiência hepática (com aumento de amônia), na síndrome da mal absorção, na sobreidratação e em dietas com nível baixo de proteínas (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

2.8.1.2. Descrição do método para a determinação de uréia - Cinética

A determinação da uréia por métodos enzimáticos combina a elevada especificidade de ação das enzimas com a simplicidade operacional envolvida. No presente método, a uréia da amostra é hidrolisada pela enzima uréase com produção de gás carbônico e íons amônio. Estes são captados por uma segunda enzima, a desidrogenase glutâmica, a qual em presença de outros substratos como o NADH₂ e α-cetoglutarato, produz NAD e glutamato. A velocidade de diminuição da concentração de NADH₂ no meio pode ser seguida espectrofotometricamente em 340 nm, sendo proporcional à concentração de uréia na amostra.

Segundo a reação: $\text{Ureia} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{uréase}} 2 \text{NH}_4^+ + \text{CO}_3^{2-}$

$2\text{-oxoglutarato} + \text{NH}_4^+ \xrightarrow{\text{GLDH}} 2\text{-L-Glutamato} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} + \text{NADH}$

2.8.1.3. Metabolismo de ureia

As proteínas, como maior fonte de nitrogênio, são hidrolisadas no intestino em seus constituintes os amino ácidos e são absorvidos pelas células da mucosa intestinal. Bactérias do intestino também podem degradar os amino ácidos para que a amônia do corpo possa ser reabsorvida. A amônia e os amino ácidos são levados ao fígado pela circulação do sistema porta.

A amônia é muito tóxica para os tecidos animais. Os animais amoniotélicos (peixes ósseos e girinos) excretam o nitrogênio amínico como amônia a partir de suas guelras. Os animais uricotélicos (anfíbios terrestres adultos e todos os mamíferos) excretam o nitrogênio amínico como uréia, formada no fígado pelo ciclo da uréia. A arginina é o precursor imediato da uréia. A arginase hidrolisa a arginina para formar uréia e ornitina e a arginina é ressintetizada no ciclo da uréia. A ornitina é convertida em citrulina à custa do carbamil fosfato, e um grupo amino é transferido para a citrulina a partir da aspartato, reformando a arginina. A ornitina é regenerada em cada volta do ciclo. Vários dos intermediários e produtos colaterais do ciclo da uréia são intermediários do ciclo do ácido cítrico e, desta forma, esses dois ciclos são interconectados. A atividade do ciclo da uréia é regulada nos níveis de síntese enzimática e de regulação alostérica da enzima que forma o carbamil fosfato. Os animais uricotélicos (pássaros e répteis) excretam o

nitrogênio amínico na forma semi-sólida de ácido úrico, um derivado da purina. O modo de excreção de nitrogênio nos animais é determinado pelo seu habitat. A formação da uréia não-tóxica e do ácido úrico tem um alto custo de ATP (Adenosina Tri-fosfato). Defeitos genéticos nas enzimas do ciclo da uréia podem ser compensados por restrições dietéticas (LEHNIGER *et al.*, 1995).

2.8.2. Creatinina

2.8.2.1. Conceito e importância clínica

A creatinina plasmática é derivada, praticamente em sua totalidade, do catabolismo de creatina presente no tecido muscular. A creatina é um metabólito utilizado para armazenar energia no músculo, na forma de fosfocreatina, e sua degradação para creatinina ocorre de maneira constante, ao redor de 2% do total de creatina diariamente. A conversão de fosfocreatina é uma reação não enzimática e irreversível, dependente de fatores estequiométricos. A excreção de creatinina só se realiza por via renal, uma vez que ela não é reabsorvida nem reaproveitada pelo organismo. Por isso, os níveis de creatinina plasmática refletem a taxa de filtração renal, de forma que níveis altos de creatinina indicam uma deficiência na funcionalidade renal (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

A creatinina é uma substância nitrogenada não-protéica (FINCO, 1997), excretada pela filtração glomerular, e qualquer anormalidade que diminua a velocidade do fluxo urinário resulta na elevação da sua concentração sérica (COLES, 1984).

As concentrações de creatinina estão aumentadas quando do fluxo renal reduzido, na hipotensão, na desidratação, em doenças renais, na obstrução urinária, na síndrome hepato-renal, no dano muscular e no exercício intenso (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

As concentrações de creatinina estão diminuídas na insuficiência hepática, na sobreidratação e nas miopatias (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

2.8.2.2. Descrição do método para a determinação de creatinina

A creatinina e outros cromógenos do soro reagem com ácido pícrico em meio alcalino formando complexos corados com um máximo de absorção em 510nm. Após a obtenção da absorbância, adiciona-se ao soro um acidificante que desfaz o complexo creatina-picrato, deixando intactos os complexos cromogênios-picrato, cuja absorbância então é medida. A diferença entre as duas leituras fornece o valor da creatinina verdadeira.

Numa variação especialmente útil em sistemas de automação, mede-se a velocidade de formação do picrato alcalino, constituindo-se portanto em método cinético, sem a necessidade de acidificação e de obtenção de duas leituras espectrofotométricas. As leituras são obtidas nos minutos iniciais da reação, quando ainda não houve formação dos complexos cromogênios-picrato.

2.8.2.3. Metabolismo de creatinina

A creatinina é formada a partir da condensação e desidratação espontânea da creatina muscular em uma estrutura anelar. A produção diária de creatinina é relativamente constante, não sendo influenciada por fatores extra-renais, como acontece com a uréia. Alguns pesquisadores consideram que a produção de creatinina é proporcional à massa muscular do indivíduo; entretanto, estudos em humanos mostram que a idade e o sexo influenciam sua concentração sérica, e não massa muscular corporal. Uma vez formada, a creatinina é excretada do organismo quase completamente por via renal durante a filtração glomerular. Em função da espécie e do sexo, pode haver secreção de pequena quantidade de creatinina nos túbulos renais, como em pacientes (humanos) do sexo masculino, mas geralmente tal ocorrência tem importância clínica. Fatores como as citocinas, que provocam aumento do catabolismo muscular endógeno na caquexia causada por septicemia ou câncer, podem aumentar a liberação e a produção de creatinina (BAKER *et al.*, 2007).

2.9. Enzimas

A enzimologia clínica é de grande ajuda diagnóstica, principalmente em relação às enzimas presentes na corrente sanguínea, várias das quais

são incluídas no estudo do perfil metabólico sanguíneo (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

Os diferentes órgãos, tecidos ou células contêm diferentes enzimas. Em alguns casos, apenas poucos órgãos ou tecidos contêm uma determinada enzima; essa enzima “tecido-específica” tende a ser mais útil como teste diagnóstico (BAKER *et al.*, 2007).

Os estudos de enzimologia iniciaram-se em 1901, com VITOR HENRY, e foram intensificados a partir de 1910, por LEONOR MICHAELIS. Apenas em 1927 foi descrita a primeira enzima, a fosfatase alcalina, por KING e ARMSTRONG. Na década de 60, a enzimologia passou a ser usada no diagnóstico em medicina humana e apenas na década de 1980, seu uso foi ampliado no diagnóstico na medicina veterinária (KANEKO *et al.*, 1997).

A enzimologia clínica surge, então, como um meio de desenvolver e utilizar exames clínicos que ofereçam o máximo de informação com um mínimo de invasibilidade, auxiliando no diagnóstico de doenças, no prognóstico de quadros clínicos diversos e na avaliação do estado nutricional dos pacientes (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

Nota-se aumento da atividade sérica de enzimas quando maior quantidade dessas enzimas alcançar a corrente sanguínea devido ao seu extravasamento pelas células lesadas ou o aumento da produção enzimática (BAKER *et al.*, 2007).

No plasma sanguíneo, podem ser encontradas enzimas cuja síntese e função é exercida em nível intracelular, mas que podem abandonar as células e sair para a corrente sangüínea, após a morte celular. Sob condições normais, estas enzimas têm baixa atividade no plasma. Outras enzimas, que também são produzidas no espaço intracelular, podem ser secretadas e atuar fora das células, como é o caso das enzimas da coagulação sangüínea (trombina). Como a concentração intracelular das enzimas é bem maior que no plasma, danos celulares relativamente pequenos podem levar a aumentos significativos da atividade das enzimas no plasma. Aumentos da atividade enzimática no plasma permitem fazer inferência sobre o local e o grau do dano celular, uma vez que muitas enzimas são específicas dos órgãos. O grau de alteração pode ser determinado pela atividade das enzimas associadas a diferentes

compartimentos celulares. Assim, em danos tissulares severos, aparece maior atividade das enzimas mitocondriais e, em danos menores, aparece atividade de enzimas citoplasmáticas ou de membrana. Os níveis enzimáticos do plasma estão influenciados pela velocidade com que entram na corrente circulatória, o que, por sua vez, depende do dano celular e pela taxa de inativação enzimática (meia-vida da enzima). O evento que interessa na determinação enzimática é o aumento da atividade, não tendo muita importância sua diminuição (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

A estabilidade dos constituintes séricos é de importância fundamental nas análises laboratoriais realizadas nos exames bioquímicos de rotina clínica e pesquisas relacionadas. Esse fato aplica-se principalmente durante a avaliação da atividade enzimática, considerando-se que variações na temperatura de armazenagem podem alterar a velocidade da reação catalítica e promover a desnaturação das enzimas (KRAMER e HOFFMANN, 1997), já que algumas enzimas apresentam-se estáveis à temperatura ambiente (25°C), enquanto outras não (STOKKE, 1974; BECK e SAMMONS, 1975; ADAMS *et al.*, 1985; KANEKO *et al.*, 1997).

Os sinais clínicos presentes em distintas alterações musculares são semelhantes e bastante inespecíficos, por isso quando isolados, eles têm limitado valor diagnóstico, o que requer frequentemente, o uso de exames laboratoriais complementares. Entre as enzimas, cujas concentrações séricas devem ser determinadas quando de disfunções musculares estão a aspartato aminotransferase (AST) e creatino fosfocinase (CK) (DA CÁS *et al.*, 2001).

A atividade global de determinadas enzimas musculares pode ser usada para avaliar a atividade metabólica (CUTMORE *et al.*, 1985). A atividade dessas enzimas é utilizada como indicador da capacidade metabólica do músculo (KLINE e BECHTEL, 1988), e durante a atividade física prolongada, como corridas de resistência, o metabolismo oxidativo tem um papel importante pela utilização de carboidratos e lipídios (GUSTAVSSON *et al.*, 1983; HODGSON e ROSE, 1987), sendo possível que a importância relativa dessas variações metabólicas em cada indivíduo ocorra a um rendimento competitivo diferente (RIVERO *et al.*, 1998).

A alanina aminotransferase (ALT) e a desidrogenase láctica (LDH) são enzimas com atividade nos hepatócitos e nas fibras musculares e têm sido utilizadas associadas à creatino fosfocinase (CK) para avaliação das lesões musculares, entre elas as provocadas pelo exercício (KANEKO *et al.*, 1997). Segundo STOCKHAN (1995), o exercício pode liberar quantidades de enzimas suficientes para aumentar os valores séricos das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e desidrogenase láctica (LDH).

ROSE & HODGSON (1994) e KANEKO *et al.* (1997) descrevem que eventuais lesões musculares podem ser verificadas através da aferição da atividade de aspartato aminotransferase (AST), creatino fosfocinase (CK) e desidrogenase láctica (LDH), embora esta última seja menos específica. A elevação da atividade destas enzimas pode ser conferida em equinos com sinais de rabdomiólise. Alguns estudos associam o aumento da atividade enzimática à prática de exercícios intensos.

O sistema de medida da atividade enzimática mais usado é o de Unidades Internacionais (UI), equivalente à quantidade de enzima que catalisa a conversão de μmol de substrato por minuto. Devem ser expressas as condições de pH, temperatura e concentração do substrato usadas na determinação (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2002).

O aumento da atividade enzimática sérica pode decorrer de extravasamento ou indução da enzima. O extravasamento celular de enzimas é provocado por lesão de células; as enzimas de importância diagnóstica que passam para o espaço extracelular e, em seguida, para o soro por meio desse mecanismo são denominadas enzimas de extravasamento. As enzimas de extravasamento estão presentes no citosol, em organelas ou em ambos. Essas enzimas saem das células quando há lesão da membrana celular e, em alguns casos, de organelas. A lesão pode ser tão grave a ponto de causar a morte celular (necrose), ou ser uma lesão discreta subletal que simplesmente provoque extravasamento da membrana celular. Como esse processo não requer aumento de produção da enzima, pode ocorrer muito rapidamente e o aumento pode ser detectado até horas após a lesão (BAKER *et al.*, 2007).

A indução envolve o aumento de produção de uma enzima por células que normalmente a produzem em menor quantidade. Esse aumento de

produção é induzido por algum tipo de estímulo e resulta em maior liberação de enzima pelas células, e conseqüentemente, aumento da atividade dessa enzima no soro. Enzimas de importância diagnóstica que passam para o soro por meio desse mecanismo são denominadas enzimas de indução. Estão presentes nas membranas celulares; portanto, sua atividade sérica não aumenta em razão de lesão ou morte celular. Como o aumento da atividade sérica de enzimas de indução depende de maior produção, os aumentos são mais graduativos do que aqueles das enzimas de extravasamento, demora dias em vez de horas (BAKER *et al.*, 2007).

As transaminases AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) são exemplos de enzimas de extravasamento. Considera-se que pequenos fragmentos de membrana contendo enzima de indução sejam liberados, cheguem à corrente sanguínea e provoquem aumento da atividade sérica dessa enzima. Exemplo o aumento de Fosfatase alcalina (AFL) e gamma glutamil transferase (GGT) na colestase (BAKER *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos na enzimologia diagnóstica, juntamente com outros dados clínicos e laboratoriais, são importantes para a compreensão do mecanismo indutor da doença e o diagnóstico (BAKER *et al.*, 2007).

2.9.1. Fosfatase alcalina (AFL)

2.9.1.1. Conceito e importância clínica

A fosfatase alcalina é uma enzima associada à membrana, que está amplamente distribuída no organismo, sendo encontrada em altas concentrações nos ossos, na mucosa intestinal, nas células tubulares renais, no fígado e na placenta (COLES, 1984).

Segundo KANEKO *et al.* (1997), a fosfatase alcalina hidrolisa vários tipos de ésteres de fosfato e catalisa a desfosforilação do ATP. Sua concentração enzimática pode ser mensurada diretamente como massa, ou indiretamente pela sua atividade. A configuração tridimensional da enzima é responsável por sua ação catalítica específica e, qualquer alteração na sua conformação, ocasionada por fatores como temperatura, pH, concentração de proteína e uréia, resulta em redução ou perda de sua atividade.

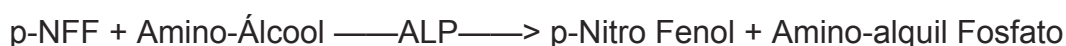
A elevada atividade sérica da AFL geralmente tem origem hepatobiliar, com exceção dos animais em crescimento ou pacientes com doença óssea (MEYER *et al.*, 1995; LIMA e SILVA *et al.*, 2002). Sua atividade sérica também pode aumentar quando mantida à temperatura ambiente (25°C) por alguns dias (STOKKE, 1974; BECK e SAMMONS, 1975; ADAMS *et al.*, 1985; KANEKO *et al.*, 1997).

BARANOWBARANOWSKI *et al.* (1988) estudaram alguns índices bioquímicos do soro de vacas e de seus bezerros, tanto em regime de confinamento, quanto de semiconfinamento, e concluíram que a atividade da AFL no grupo confinado foi maior e estatisticamente significativa que no grupo de animais semiconfinados e que ambos os grupos apresentaram aumento na atividade logo após o parto.

2.9.1.2. Descrição das técnicas para a fosfatase alcalina

2.9.1.2.1. Descrição da técnica cinética IFCC

A fosfatase alcalina (AFL) hidrolisa o p-nitrofenilfosfato (p-NFF), que é incolor, produzindo fosfato e p-nitrofenol em pH 9,0. A velocidade de aparição do anion p-nitrofenolato (amarelo) a 405 nm, é proporcional à atividade enzimática da amostra. A dietanolamina (DEA), além de regular o pH da reação, intervém ativamente na mesma, atuando como receptor de fosfato liberado pela enzima.



2.9.1.2.2. Descrição da técnica cinética DGKC

A determinação da fosfatase alcalina através de método cinético com o emprego do p-nitrofenilfosfato de sódio constitui-se em método de escolha, sendo inclusive recomendado pela Federação Internacional de Química Clínica (IFCC) e a Associação de Química Clínica da Alemanha (DGKC). No presente método, baseado na DGKC, o p-nitrofenilfosfato de sódio é hidrolisado especificamente pela fosfatase alcalina do soro em pH 9,80, liberando o p-nitrofenol, cuja velocidade de formação em 405 nm é proporcional à atividade da enzima presente.

2.9.1.2.3. Descrição da técnica cinética IFCC

A timolftaleína monofosfato é hidrolisada pela fosfatase alcalina no soro, com liberação de timolftaleína, que em meio alcalino apresenta cor azul cuja intensidade é proporcional à atividade enzimática.

2.9.1.3. Metabolismo de fosfatase alcalina

Fosfatase alcalina (AFL) é uma enzima de indução sintetizada no fígado, nos osteoblastos, nos epitélios intestinal e renal e na placenta. Porém, os hepatócitos respondem pela maior parte da atividade sérica normal de AFL. Em cães, a meia-vida de AFL intestinal, renal e placentária é de, aproximadamente, 6min; em gatos, é cerca de 2min. Portanto, essas isoenzimas de AFL não são consideradas fontes de aumento da atividade sérica de AFL nessas espécies. O aumento da produção de fosfatase alcalina e de sua atividade sérica pode ser notado em casos de maior atividade osteoblástica, colestase, indução por drogas (confirmada em cães, mas questionável em outras espécies) e várias doenças crônicas, inclusive neoplasias (BAKER *et al.*, 2007).

2.9.2. Y- glutamiltransferase (GGT)

2.9.2.1. Conceito e importância clínica

A Y-glutamiltransferase (GGT) está presente, principalmente, nas células epiteliais dos ductos renais e biliares (KRAMER & HOFFMAN, 1997), apresentando atividade sérica muito baixa em cães e gatos, quando comparada à de ruminantes (COLES, 1984). A elevação de sua atividade sérica está relacionada com doenças hepáticas, especialmente aquelas que afetam o sistema de ductos biliares (BRAUN *et al.*, 1992; THOMPSON e PAULI, 1992).

É uma enzima de membrana, associada a numerosos tecidos (MEYER *et al.*, 1995). (; a colestase provoca aumento na atividade sérica desta enzima, em todas as espécies (MEYER *et al.*, 1995); (KRAMER & HOFFMAN, 1997) com melhor atividade diagnóstica que a fosfatase alcalina

(AFL), em equinos e ruminantes (MEYER *et al.*, 1995), em razão do amplo intervalo de referência da fosfatase alcalina nessas espécies .

2.9.2.2. Descrição das técnicas para Y- glutamiltransferase

2.9.2.2.1. Descrição da técnica cinética – Szasz modificado

Determinação cinética da Y-glutamiltransferase segundo a reação:



A elevada absorção da p-nitroanilina (PNA) formada na reação de transferência do grupamento glutamil da gamma glutamil p-nitroanilida (Gama GPNA) para a glicilglicina (GC) é proporcional à atividade da Gama GT na amostra biológica. Método extremamente simples utilizado na determinação da atividade da GGT. Possibilitando utilizar leituras à 37° C como recomendado pela Scandinavian Society for clinical Chemistry (SSCC) e International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), bem como a 25° e 30° C.

2.9.2.2.2. Descrição da técnica cinética de γ-glutamiltransferase

A determinação da γ-glutamiltransferase através de método cinético com o emprego do L-γ-glutamil-p-nitroanilida constitui-se em método de escolha, sendo inclusive recomendado pela Federação Internacional de Química Clínica (IFCC). No presente método, baseado na IFCC, a γ-glutamiltransferase catalisa a transferência do radical glutamil do substrato para um aceptor (glicil-glicina) formando γ-glutamilglicil-glicina e p-nitroanilina. A velocidade de formação da p-nitroanilina em 405 nm é proporcional à atividade da enzima presente.

2.9.2.2.3. Descrição da técnica cinética de γ-glutamiltransferase

A gamma glutamiltransferase catalisa a reação de transferência do grupamento glutamil do L-gamma-glutamil-3-carboxyl-4-nitroanilida para a glicilglicina originando L-gamma-glutamilglicina e 5-amino-2-nitro benzoato.

2.9.2.3. Metabolismo de gamma glutamiltransferase

A gamma glutamiltransferase (GGT) é considerada uma enzima de indução. No entanto, a lesão hepática aguda pode provocar um aumento imediato da atividade sérica de GGT, possivelmente devido à liberação de fragmentos de membrana que contém GGT. Ela é sintetizada por quase todos os tecidos corporais, com maior concentração no pâncreas e nos rins. Além disso, está presente em baixa concentração nos hepatócitos, no epitélio dos ductos biliares e na mucosa intestinal e em alta concentração nas glândulas mamárias de vacas, ovelhas e cadelas. A maior parte da GGT sérica é oriunda do fígado. A liberação da enzima pelas células do epitélio renal proporciona aumento na atividade urinária da GGT, mas não na atividade. Quando a GGT é liberada pelas células pancreáticas, em vez de ser transferida ao sangue.

2.9.3. Aspartato aminotransferase (AST)

2.9.3.1. conceito e importância clínica

A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima citoplasmática e mitocondrial, presente em vários tecidos como fígado, músculo esquelético e cardíaco (FARPE, 1998). Em todas as espécies domésticas, a atividade AST é alta no fígado, portanto na lesão hepática aguda ou crônica a atividade sérica de AST está elevada. Segundo CARDINET (1997), essa enzima também tem sido usada como auxílio diagnóstico em alterações musculares dos animais domésticos. Os equinos podem apresentar aumento nos valores de aspartato aminotransferase (AST), em consequência da miopatia ou lesão hepática, e a principal razão para se incluir AST no perfil bioquímico de equinos é a tentativa de detectar doença hepatocelular (STOCHAN, 1995).

Esta enzima é de transferência de um grupo amina de um aminoácido para um cetoácido, catalisa a transaminação reversível da L-aspartato e alfa-cetoglutarato, a oxalacetato e glutamato (CALRSON, 1993). Tem ampla distribuição tissular, presentes em pequenas quantidades no soro, como consequência direta de destruição tecidual fisiológica e subsequente liberação enzimática. Tendo em vista que essa enzima exerce sua função

principal no interior das células, os aumentos observados no soro são frequentemente reflexo da destruição celular ou doença (COLES, 1984).

As mais elevadas concentrações da aspartato aminotransferase (AST) estão localizadas nas células musculares esqueléticas e nos hepatócitos (MEYER *et al.*, 1995).

2.9.3.2. Descrição das técnicas para aspartato aminotransferase

Técnica para a determinação da aspartato aminotransferase (AST ou TGO). Teste cinético. Metodologia cinética UV segundo a reação:

L-aspartato + α -cetoglutarato \rightarrow AST \rightarrow oxalacetato + L-glutamato

Oxalacetato + NADH + H⁺ \rightarrow MST \rightarrow L-malato + NAD

A AST catalisa a transferência dos grupos amina do aspartato para o α -cetoglutarato, levando a formação de glutamato e oxalacetato. O oxalacetato em presença de MDH reage com o NADH, reduzindo-se a malato e o NADH oxida-se a NAD. A velocidade de oxidação é proporcional à atividade da AST na amostra.

2.9.3.3. Metabolismo de aspartato aminotransferase

A aspartato aminotransferase (AST), antes denominada transaminase glutâmica-oxalacética (TGO), está presente em maior concentração nos hepatócitos e nas células musculares (esqueléticas e cardíacas) de todas as espécies. Portanto AST não é uma enzima hepato-específica. É uma enzima de extravasamento, parte dela livre no citoplasma dos hepatócitos; nota-se sua maior concentração nas membranas das mitocôndrias. O aumento da atividade sérica de AST pode ser causado por necrose e lesão subletal de hepatócitos e de células musculares.

Em cães e gatos, a atividade sérica de aspartato aminotransferase (ALT) às vezes é usada como único parâmetro para diagnóstico de lesão nos hepatócitos, pois a ALT é mais hepato-específica do que a AST. Embora a AST tenha menor hepato-especificidade que a ALT, ela é mais sensível para detectar alguns tipos de lesão de hepatócitos em cães e gatos.

2.9.4. Creatino fosfocinase – CK

2.9.4.1. Conceito e importância clínica

A creatino fosfocinase (CK) é uma enzima encontrada em muitos tipos celulares, mas sua maior especificidade está relacionada com a musculatura esquelética. No entanto, a sua meia-vida curta faz com que os altos valores séricos voltem rapidamente ao normal (KANEKO *et al.*, 1997). Essa enzima é mais amplamente utilizada para determinação de doenças neuromusculares dos animais domésticos (CARDINET, 1997). CARLSON (1993), STOCKHAN (1995) e CARDINET (1997) concordam que essa enzima é altamente sensível e também específica de lesão muscular, já que os principais tecidos-fonte de creatino fosfocinase (CK) são as fibras musculares esqueléticas, as cardíacas e o músculo liso (KRAMER e HOFFMANN, 1997).

Segundo CARDINET (1997), os valores normais de CK determinados em animais domésticos podem variar com a atividade física, a idade e o sexo, entre outros fatores.

ESSEN-GUSTAVSSON *et al.* (1984) e FRAPE (1994) expõem que há grande variação individual na atividade sérica normal dessa enzima, salientando que as concentrações séricas de enzimas musculares aumentam ligeiramente após exercícios e que também estão elevadas nas desordens musculares ou miosites.

A creatino fosfocinase (CK) é amplamente usada para diagnosticar transtornos musculares. A enzima é citosólica ou associada às estruturas das miofibrilas. Requer íons magnésio como co-fator e, portanto, sua atividade pode estar inibida na presença de compostos quelantes. A CK aparece elevada antes da aspartato aminotransferase (AST) e também desaparece primeiro. Assim, o padrão enzimático dessas enzimas pode indicar o estágio do problema. A CK aumentada com AST diminuída indica lesão muscular recente, níveis persistentemente altos das duas indicam lesão continuada, enquanto níveis baixos de CK e altos de AST indicam processo de recuperação (GONZÁLEZ e SILVA, 2007).

WEAVER (2004) relatou que o dano muscular provocado pelo decúbito prolongado de bovinos pode ser avaliado, com segurança, por meio

da determinação sérica de CK e, juntamente com a enzima aspartato aminotransferase (AST), pode também identificar miopatia cardíaca em bovinos.

SICILIANO *et al.* (1995) e LÖFSTEDT e COLLATOS (1997) relataram que o treinamento diário diminui os efeitos provocados pelo exercício, incluindo a elevação das concentrações séricas das enzimas CK e AST.

A CK é uma enzima de alta especificidade para lesões musculares, e o aumento da sua atividade reflete mais aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial do que lesão muscular, segundo ROSE e HODGSON (1994). Para SPINHA DE TOLEDO *et al.* (2001), somente altas concentrações plasmáticas de CK refletiriam miólise significativa.

A creatino fosfocinase (CK) é a enzima mais amplamente utilizada para determinação de alterações musculares dos animais domésticos e é considerada um indicador altamente sensível e específico de lesão muscular, já que os principais tecidos fontes dessa enzima são as fibras musculares (CARDINET, 1997).

Em estudo realizado em equinos PSI sadios criados no Brasil, LOPES *et al.* (1993) observaram diferenças significativas na concentração sérica das enzimas aspartato aminotransferase (AST), desidrogenase láctica (LDH) e gamma glutamiltransferase (GGT), em relação aos valores de referência de autores estrangeiros. Os autores enfatizam a necessidade de cada laboratório determinar seus valores de referência.

Embora a CK seja mais específica para necrose muscular do que a AST, CARDINET (1997) salienta que a determinação simultânea de AST e CK em eqüinos representa valioso potencial diagnóstico e ajuda no prognóstico em razão das diferentes taxas de desaparecimento de suas atividades no soro ou plasma. Segundo CARDINET (1997), a elevação da atividade sérica da CK indica a necrose muscular é ativa ou ocorreu recentemente, a persistente elevação da CK indica a necrose muscular continua ativa, e AST elevada, por causa da necrose muscular, acompanhada por atividade decrescente ou normal de CK, indica que a necrose não é mais ativa, FRAPE (1994) relata que a CK tem meia vida de menos de 24 horas, enquanto a aspartato amino transferase (AST) tem meia-vida de sete a oito dias.

Ao analisar enzimas musculares e hepatobiliares, STOCKHAM (1995) cita que nos valores séricos de AST, com uma atividade normal de creatino fosfocinase (CK), sugere que o aumento de AST ocorre em razão de doença hepatobiliar e não em razão do dano muscular, entretanto deve-se ter cautela nessa conclusão, já que a meia-vida da CK circulante é menor do que a da AST.

2.9.4.2. Descrição das técnicas para creatina fosfocinase (CK)

Determinação cinética da Creatina fosfocinase segundo as reações:

Creatina fosfato + ADP → CK → creatina + ATP

ATP + glicose → HK → Glicose – 6- fosfato + ADP

Glicose-6-P + NADP → G6PDH → gluconolactona -6- fosfato + NADPH + H⁺

A velocidade da redução de NADP a NADPH é proporcional a atividade CK na amostra.

CK → creatina fosfocinase

ADP → (Adenosina difosfato)

HK → (Hexoquinase)

NADP → (Nicotinamida adenosina difosfato)

G6PDH → (glicose 6 fosfato desidrogenase)

ATP → (Adenosina trifosfato)

2.9.4.3. Metabolismo de creatina fosfocinase

Creatino fosfocinase (CK), também denominada creatina fosfo cinase, é uma enzima em músculo esquelético, músculo cardíaco, cérebro e nervos. Ela é encontrada livre no citoplasma de células musculares que quando lesadas, a deixam extravasar. Considera-se que a creatino fosfocinase seja uma enzima de extravasamento específica do músculo. Embora exista CK no cérebro e nos nervos, não se verifica aumento da atividade de CK no soro após lesão do sistema nervoso central. Tal lesão pode resultar em aumento da atividade de CK no fluido cerebrospinal, mas a barreira hematoencefálica impede que a enzima passe para o sangue em quantidade suficiente para alterar a atividade sérica de CK. Pode haver falso aumento da atividade sérica de CK em razão de hemólise, hiperbilirrubinemia e

contaminação da amostra de sangue por fluido muscular durante uma venipunção difícil.

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

1. Avaliar a influência de kits e suas respectivas metodologias e/ou técnicas nas dosagens bioquímicas;
2. Avaliar a influência de kits para dosagens de eletrólitos com suas duas metodologias diferentes;
3. Avaliar a influência de kits para a dosagem de proteínas de fase aguda, com suas respectivas metodologias;
4. Avaliar de que maneira os diversos kits influenciaram nos resultados obtidos em função das diferenças existentes entre cada uma das metodologias e técnicas empregadas;
5. Comparar os valores de médias, desvios e intervalos de referência obtidos com os estabelecidos pela bibliografia rotineira.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados trinta equinos ANIMAIS ADULTOS com escore corporal de três a quatro (SPEIRS, 1999) e clinicamente hígidos, com base no exame físico e laboratorial de triagem.

As amostras de soro e plasma sanguíneos dos eqüinos mangalarga marchador, para desenvolver o presente trabalho, foram colhidas no Haras, localizado na rodovia BR-116, Zona da Mata Mineira, distante 8Km da cidade de Muriaé, estado de Minas Gerais (100 km de distância do laboratório).

4.2. Manejo alimentar

Os animais foram mantidos em baias individuais e alimentados com 4,5 kg de ração² por dia (sendo esta distribuída em três períodos), capim-

² Ração Equisul 15 Especial - Total Alimentos, Três Corações-MG.

elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach) triturado, feno de *tifton* (*Cynodon spp.*), água *ad libitum* e suplemento mineral à vontade³, sendo em regime de semiconfinamento em piquete de capim *tifton* (*Cynodon nlemfuensis* Vanderyst var. *robustus*).

4.3. Exame físico

Os animais foram avaliados clinicamente e separados com a finalidade de fornecerem amostras para este experimento. A avaliação clínica foi auxiliada pela realização do exame físico e também através do hemograma de cada um dos animais para a avaliação dos parâmetros hematimétricos e avaliação do leucograma total e diferencial.

Os animais foram considerados hígidos ao exame físico quando apresentaram parâmetros vitais dentro dos limites fisiológicos, segundo HOUSTON e RADOSTITS (2002).

4.5. Colheita das amostras

As amostras foram colhidas mediante venipunção jugular, após antissepsia local, utilizando-se agulhas hipodérmicas⁴ e frascos Vacutainer^{®5}. Após a coleta de sangue, os frascos foram encaminhados imediatamente ao laboratório clínico. Para obtenção de soro sangüíneo foram colhidos amostras de sangue de cada animal, no mesmo dia, em um tubo de coleta a vácuo de 30 mL, sem anticoagulante. Após a colheita, as amostras permaneceram em repouso à temperatura ambiente (16,6 a 29,6°C), até a retração do coágulo e posterior centrifugação a 700xG (10.000 rpm)⁶ por 10 minutos, tendo o soro sangüíneo sido retirado, em 06 ependorfs de 2,0 mL cada, por pipetagem para dosagem de proteína total, albumina, sódio, potássio, cloreto, bilirrubina total, magnésio total, cálcio total, uréia, creatinina, fosfatase alcalina, γ -glutamilttransferase, aspartato aminotransferase e creatina fosfocinase. O plasma foi obtido a partir de amostras de sangue, colhidas em tubos siliconizados de 10 mL, contendo

³ Hiposal 80% - Total Alimentos, Três Corações-MG.

⁴ Agulhas 18G, BD – Bacton e Dickison Ind. Cirúrgica LTDA., Brasil.

⁵ Frasco siliconizado a vácuo – 10 mL sem anticoagulante – Vacuum II.

⁶ Centrifuga, EUREKA/ BIO ENG, Marconi Equipamentos para Laboratório.

fluoreto de sódio⁷, as quais foram centrifugadas em velocidade e tempo semelhantes aos utilizados para o soro, imediatamente após a coleta, para mensuração da glicose, separados em três ependorfs de 2,0mL. Após a colheita das amostras de plasma e soro, foram transportadas em caixas térmicas contendo gelo reutilizável até o laboratório do Departamento de Veterinária onde foram centrifugados e retirados soro e plasma.

4.6. Análises laboratoriais

As análises foram realizadas no Laboratório Piloto de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto (LAPAC) e no Laboratório de Biofármacos da Universidade Federal de Viçosa. Os equipamentos utilizados nas análises laboratoriais estão citados abaixo com suas respectivas técnicas e desenvolvimento de metodologias.

As dosagens dos parâmetros abordam com detalhes as técnicas individuais por equipamento e por metodologia.

4.7. Distribuição dos grupos experimentais

Foram utilizadas 10 (dez) amostras de plasma e 10 de soro para cada grupo de animal, grupos foram escolhidos aleatoriamente por sorteio contendo cinco machos e cinco fêmeas, as amostras colhidas de cada animal foram submetidas a três diferentes testes utilizando as três marcas distintas de kits comerciais para bioquímica clínica, duas metodologias distintas para eletrólitos e três metodologias distintas para proteína de fase aguda.

Tabela 01 – Distribuição dos grupos experimentais pelos parâmetros avaliados e pelas empresas fornecedoras de kits comerciais utilizadas no estudo, com respectivos métodos e/ou técnicas.

Parâmetros	Grupos Métodos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
<i>Proteínas totais</i>	<i>Grupos Método</i>	Bioclin Biureto	Katal Biureto	In Vitro-Human Biureto
<i>Albumina</i>	<i>Grupos Métodos</i>	Bioclin Verde de bromocresol	Katal Verde de bromocresol	In Vitro-Human Verde de bromocresol

⁷ Celm – Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos.

Parâmetros	Grupos Métodos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
<i>Proteína C reativa</i>	<i>Grupos Métodos</i>	Beckman Coulter Nefelometria	Bioclin Imunoturbidimetria	Bioclin Aglutinação látex
<i>Sódio</i>	<i>Grupos Métodos</i>	Fotometria Celm	Íon eletrodo Celm	
<i>Potássio</i>	<i>Grupos Métodos</i>	Fotometria Celm	Íon eletrodo Celm	
<i>Cloretos</i>	<i>Grupos Métodos</i>	Bioclin Colorimétrico	In Vitro-Human titulométrico	Labtest Colorimétrico
<i>Cálcio total</i>	<i>Grupos Métodos</i>	Bioclin Arsenazo III	In Vitro-Human Cresolfaleína	Latest Arsenazo III
<i>Magnésio</i>	<i>Grupos Métodos</i>	Bioclin Man e Yoe	In Vitro-Human Magnésio automação	Labtest Magon sulfonado
<i>Glicose</i>	<i>Grupos Métodos</i>	Bioclin Enzimático GOD	Katal Enzimático GOD	In Vitro-Human Enzimático GOD
<i>Bilirrubina total</i>	<i>Grupos Métodos</i>	Bioclin Ác. Sulfanílico	Katal Ac. Sulfanílico	In Vitro – Human Ac. Sulfanílico
<i>Ureia</i>	<i>Grupos Métodos</i>	Bioclin Enzimática	Katal enzimática	In Vitro-Human Enzimática
<i>Creatinina</i>	<i>Grupos Métodos</i>	Bioclin Cinética	Katal cinética	In Vitro-Human Cinética
<i>Fosfatase alcalina</i>	<i>Grupos Métodos</i>	Bioclin Cinética UV	Katal Cinética UV	In Vitro-Human Cinética UV
<i>Creatino fosfocinase</i>	<i>Grupos Métodos</i>	Bioclin Cinética UV	Labtest Cinética UV	Katal Cinética UV
<i>γ-glutamilttransferase</i>	<i>Grupos Métodos</i>	Bioclin Cinética UV	Katal Cinética UV	In Vitro-Human Cinética UV
<i>Aspartato aminotransferase</i>	<i>Grupos Métodos</i>	Bioclin Cinética UV	Katal Cinética UV	In Vitro-Human Cinética UV

4.8. Dosagens de parâmetros

Na mensuração de proteínas totais, albumina, cloretos, glicose, bilirrubina total, magnésio total, cálcio total, uréia, creatinina, fosfatase alcalina, γ-glutamilttransferase, aspartato aminotransferase, e creatina fosfocinase utilizou-se equipamento automático⁸. Foram utilizados os reagentes comerciais da Bioclin⁹, Katal¹⁰, Human¹¹ e Labtest¹², com respectivas adaptações para as programações para o equipamento utilizado

⁸ Aparelho automático Airone 200 – Wiener Lab - Labinbrás

⁹ QUIBASA – Química Básica Ltda.

¹⁰ Katal de kits para Diagnóstico de Bioquímica Clínica

¹¹ In Vitro Human – Kits para diagnóstico In vitro

¹² Labtest – Minas Gerais - Brasil

de acordo com os fabricantes dos respectivos kits. Sódio e potássio foram dosados por fotometria de chama¹³ e eletrodo íon-seletivo¹⁴.

As diluições foram realizadas pelo próprio equipamento no caso de bioquímica clínica obedecendo às proporções estabelecidas nas instruções de uso de cada um dos parâmetros e das aplicações para automação em equipamentos estabelecidas para diagnóstico humano.

Foram diluídos manualmente com pipetas automáticas os soros para as dosagens de sódio e potássio por fotometria de chama e íon eletrodo seletivo.

As dosagens de proteína c-reativa foram realizadas utilizando técnica nefelométrica com kit denominado ultra-sensível¹⁵, bem como as dosagens imunoturbidimétricas¹⁶ e aglutinação em partículas de látex¹⁷. Foram avaliados os parâmetros (kits) para cada uma das empresas, Bioclin[®], Katal[®], Human[®] e Labtest[®].

As análises foram acompanhadas pelo controle de qualidade, através do controle comercial Biocontrol^{®18}, e foram calibrados utilizando calibrador multiparamétrico, Biocal[®] da Bioclin^{®19}, com os valores estabelecidos pelo fabricante.

4.8.1. Desenvolvimento das técnicas metodologias

4.8.1.1. Técnica de ponto final

A técnica de ponto final foi aplicada aos seguintes parâmetros: proteínas totais, albumina, cálcio arsenazo III, cálcio cresolftaleína, cloretos colorimétricos, glicose, magnésio magon sulfonado, magnésio man e Yoe, bilirrubina total. No desenvolvimento destas técnicas as amostras foram colocadas em cubetas de amostras, todas elas provenientes do soro, exceto a glicose que foi colocada em copos de amostras separados contendo plasma fluoreto. Os reagentes de trabalho foram preparados previamente, e os programas fornecidos por cada um dos fabricantes foram adaptados ao

¹³ Micronal – FC – 180 – Fotômetro de Chama - Brasil

¹⁴ Eletro íon seletivo – AVL -9130

¹⁵ Nefelometro Beckman coulter – USA

¹⁶ Aparelho automático Airone 200 – Wiener Lab - Argentina

¹⁷ Quibasa – Química Básica – BH - MG

¹⁸ Quibasa – Química Básica Ltda – BH - MG

¹⁹ Quibasa – Química Básica Ltda. – BH - MG

aparelho. Como esta técnica requer a utilização de um padrão (substância com valores pré-definidos), foi utilizado um padrão multiparamétrico, fornecido por Bioclin[®], denominado comercialmente de Biocal[®], contendo todos os valores dos padrões utilizados nos parâmetros acima. De posse da programação, das amostras e dos reagentes de trabalho previamente preparados, o equipamento foi checado através de controle de qualidade também fornecido pela empresa Bioclin[®], denominado Biocontrol[®]. Com valores estabelecidos por lote pelo fabricante. A aceitação só foi possível após avaliação de cada parâmetro através do controle, contendo os valores avaliados dentro de no máximo dois desvios da média estabelecida. Após a aprovação da técnica de todos os parâmetros, os testes foram iniciados com cada kit de cada fabricante tendo sua rotina realizada separadamente, todos os parâmetros que utilizaram os kits da Bioclin[®], foram realizados primeiro lugar, seguidos pelos kits da Katal[®], seguidos pelos kits da Labtest[®] e por último da In Vitro-Human[®].

A leitura espectrofotométrica é realizada em comprimento de onda específico, dependendo da absorção de luz do parâmetro mensurado.

O equipamento realiza as pipetagens automáticas das amostras e dos reagentes a partir de volumes estabelecidos pelas adaptações às programações do equipamento.

O equipamento efetua o cálculo das concentrações, com base na informação fornecida através dos valores dos padrões e suas respectivas absorbâncias.

O equipamento libera o resultado após a amostra ter sido avaliada em todos os seus parâmetros, nas unidades de medida também fornecidos pelos fabricantes nas adaptações.

4.8.1.2. Desenvolvimento das técnicas cinéticas

Na técnica cinética, utilizada para as dosagens de Fosfatase alcalina, creatino fosfocinase, gamma glutamil transferase, uréia e creatinina, as instruções de uso fornecidas pelos fabricantes foram seguidas a risca, pela fragilidade, sensibilidade e técnica de desenvolvimento do método. Para todos os parâmetros acima, não se utilizam padrões, e os reagentes de trabalho são colocados no equipamento juntamente com as amostras. Para

que inicializar as dosagens é necessário que estes parâmetros sejam adaptados ao aparelho a partir das programações fornecidas pelos fabricantes, juntamente com um fator de correção recomendado nas instruções de uso.

Com todos os passos acima cumpridos, o equipamento realiza uma checagem através do controle de qualidade da mesma maneira que na da técnica de ponto final descrita acima, utilizando o mesmo controle de qualidade da Bioclin[®] e só depois de aprovados é que os mesmos são submetidos à análise estabelecendo também para sua avaliação, a variação máxima da média em dois desvios.

O equipamento realiza as provas cinéticas, fazendo a leitura das absorbâncias no respectivo comprimento de onda, realizando o cálculo do delta absorbância nos tempos 0, 1, 2 e 3 minutos. Esse delta absorbância por minuto calculado é então multiplicado por um fator pré-estabelecido pelo fabricante. O equipamento realiza automaticamente estes cálculos e as pipetagens.

4.8.1.3. Técnica titulométrica do cloreto (Cl⁻)

A técnica titulométrica de cloretos, foi realizada manualmente de acordo com a instrução de uso fornecido pelo fabricante, In Vitro-Human[®], e os resultados foram obtidos a partir dos cálculos recomendados.

4.8.1.4. Métodos da fotometria de chama e do íon eletrodo seletivo

Nestes dois métodos o procedimento para a execução é muito parecido, a diferença entre os dois está na especificidade maior do eletrólito no íon eletrodo seletivo que utiliza um eletrodo específico para cada eletrólito a ser determinado, mas ambos utilizam os padrões fornecidos pela Celm[®], com os mesmos valores. As diluições das amostras de soro, são realizadas da mesma maneira pelo operador.

Primeiro dilui-se as amostras 1:5, em água destilada e faz-se as dosagens de cada parâmetro simultaneamente para a mesma amostra.

4.9. Análise dos dados

As análises dos dados foram realizadas pelo programa estatístico SAEG 9.1 (SAEG-UFV-2007).

Para todos os parâmetros estudados foram realizadas estatística descritiva (média e desvio-padrão).

Para os parâmetros quantitativos, realizaram-se os testes de Lilliefors e Cochran e Bartlett para verificar a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias. Posteriormente os dados foram analisados pela análise de variância e as medidas comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações das comparações entre os kits comerciais para cada parâmetro analisado são mostradas abaixo nas tabelas 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09 e 10.

5.1. Proteínas totais

Tabela 02 – Valores de proteínas séricas totais (g/dL) de equinos MM hípidos obtidos de amostras submetidas a diferentes tipos de técnicas de mesma metodologia de análise.

Grupos	Fabricantes	Proteínas totais (g/dL)
G1	Bioclin [®]	6,52±0,57 b
G2	Katal [®]	7,77±0,64 a
G3	In vitro/Human [®]	6,17±1,34 b
	Cv	13,67
	Média	6,82±1,40

Médias na mesma coluna, seguidas por letras minúsculas diferentes, diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os valores das médias obtidos com os kits da Katal[®] (G2), foram superiores ($p < 0,05$) aos da Bioclin[®] e da In Vitro/Human[®] que por sua vez não mostraram diferença entre si, como demonstrado na tabela 02. A metodologia utilizada por ambos os kits foi a do biureto, mas com técnicas diferentes. A diferença existente entre os valores de média dos kits pode ser

devida às diferentes concentrações dos reagentes presentes nos constituintes do *kit* da Katal[®] de acordo com a instrução de uso fornecida pelo fabricante, como demonstrado no apêndice C, essas concentrações são diferentes das concentrações dos reagentes de Bioclin[®] e In Vitro/Human[®], que mostram semelhanças entre si. Esta diferença entre os valores das médias pode ter ocorrido também devido à ausência de alterações nas adaptações dos programas de automação, que deveria ser modificado em função das concentrações dos reagentes e também deveriam ser alterados os volumes de reagentes e amostras utilizados por cada técnica e ainda pela não modificação do tempo de incubação necessário para a ocorrência da reação final, que foi mais crítico com o kit da Katal[®]. Apesar da diferença existente entre os grupos, os valores de média obtidos neste estudo (6,82g/dL) são semelhantes aos valores de médias obtidos por DUNCAN e PRASSE (1982); CARLSON (1983); COLES (1984); MEYER *et al.* (1995); SMITH (1996); KANEKO *et al.* (1997); CAVIGLIA *et al.* (2000); BLOOD e STUDDERT (2002) e SANTOS (2002). Entretanto, os valores de médias obtidos por SKOWRONECK *et al.* (1995); MUNDIN *et al.* (2002); LEME (2004); ALVES *et al.* (2005) e VEIGA *et al.* (2006) foram superiores aos do presente estudo. As diferenças existentes entre os valores obtidos pelos referidos autores e os valores obtidos nesse estudo podem ser devidas às diferenças entre os métodos, técnicas utilizados e também pela faixa etária dos grupos de animais testados. A comparação dos valores descritos por eles não pode ser feita, devido ao fato de que a maioria dos autores consultados omitiu a técnica ou o método utilizado em seus trabalhos.

5.2. Proteína c reativa (PCR)

Tabela 03 – Valores de proteína C-reativa (mg/dL) de equinos MM hípidos obtidos de amostras submetidas a diferentes tipos de metodologias de análise.

Grupos	Fabricantes/Metodologias	PCR (mg/dL)
G1	Nefelometria – Beckman Coulter [®]	0,46±0,13 c
G2	Aglutinação látex - Bioclin [®]	5,90±0,11 a
G3	Imunoturbidimetria - Bioclin [®]	1,69±0,59 b
	CV	13,78
	Média	2,68±2,39

Médias na mesma coluna, seguidas por letras minúsculas diferentes, diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os valores de médias do G1 para a dosagem de proteína c reativa , método nefelométrico da Beckman Coulter[®] apresentou os menores valores ($p < 0,05$) que os outros dois grupos testados, como demonstrado na tabela 03, isto foi devido a maior sensibilidade analítica do método nefelométrico. O G3, método de aglutinação em látex da Bioclin[®] apresentou os maiores valores entre os grupos testados ($p < 0,05$), enquanto os valores de média do G2, imunoturbidimetria da Bioclin[®] foram superiores ($p < 0,05$) aos da nefelometria (Beckman Coulter[®]) e inferiores aos valores da aglutinação em látex da Bioclin[®], o que revela menor sensibilidade analítica em relação ao método nefelométrico e maior sensibilidade analítica do que o método da aglutinação em látex. Os índices obtidos na presente pesquisa são semelhantes aos valores utilizados como referência em seres humanos, que segundo as três metodologias testadas, consideram como valor de referência, os índices menores que 6mg/dL. Entretanto, convém ressaltar a inexistência de estudos em equinos determinando a faixa de referência para essas variáveis e que a comparação de valores humanos com os de equinos pode ser inadequada.

5.3. Fosfatase alcalina (AFL)

Tabela 04 – Valores de fosfatase alcalina (U/L) de eqüinos MM hígidos obtidos de amostras submetidas a diferentes tipos de técnicas e metodologias de análise.

Grupos	Fabricantes	Fosfatase alcalina (U/L)
G1	Bioclin [®]	191,91±54,72 b
G2	Katal [®]	180,25±46,88 b
G3	In Vitro-Human [®]	370,41±115,64 a
	Média	246,52±110,60
	CV	31,78

Médias na mesma coluna, seguidas por letras minúsculas diferentes, diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A fosfatase alcalina (AFL) apresentou diferença significativa entre os grupos testados. O G3, que representa In Vitro-Human[®] apresentou valor de média aumentado ($p < 0,05$) em relação aos demais ($G3 > G1 = G2$), de Bioclin[®] (G1) e Katal[®] (G2) como demonstrado no Tabela 04. Os valores de média de fosfatase alcalina foram obtidos utilizando-se o mesmo método em todos os grupos, cinético, mas quando da mensuração desta variável ocorreram diferenças nas aplicações das técnicas em cada um deles, de acordo com o fabricante (instruções de uso). Esse evento pode ser o responsável pelas diferenças encontradas no kit da In Vitro-Human[®]. Devem também ser consideradas como possíveis causas as diferentes concentrações das enzimas, coenzimas e substratos que fazem parte da metodologia cinética. Apesar da diferença entre os três grupos foi mais acentuada no G3, da In Vitro-Human[®], devido a estas diferentes concentrações as adaptações nos programas de automação fornecidos por cada um dos fabricantes deveriam ter sido modificadas, em função destas concentrações e também em função dos volumes de amostras e reagentes utilizados; outro fator importante está na execução da técnica e sua cinética da reação; a possibilidade dos kits apresentarem sensibilidades analíticas diferentes; a utilização de métodos com técnicas distintas. Apesar disso, os valores obtidos estão dentro de faixa de valores (135 – 357U/L) semelhantes às faixas de valores obtidos por CARLSON (1983); HARVEY *et al.* (1984); VAN DEERDEN *et al.* (1990); MEYER *et al.* (1995); MESSER (1995); SKOWRONECK *et al.* (1995);

SMITH (1996); KANEKO *et al.* (1997); RADOSTISTS *et al.* (2002); MUNDIM *et al.* (2002). Outros autores obtiveram faixa de valores mais estreita do que as obtidas neste estudo (COLES, 1984; LEME, 2004; SANTOS, 2006). Estas diferenças podem ser devidas à utilização de métodos com diferentes técnicas, que são diferentes daquelas utilizadas pelos demais autores, que também não citam o método e/ou a técnica utilizada, mas pelo comportamento dos resultados sugere-se que as técnicas e/ou métodos sejam diferentes. Outro fato importante para a diferença entre os diversos autores e o presente estudo está na faixa etária em que se encontravam os animais quando das análises por estes autores, apesar de terem trabalhado com mesma espécie. As faixas mais estreitas podem ter sido devido a uma maior homogeneidade das amostras, trabalhos realizados com faixa etária definida.

5.4. Y-glutamyltransferase (GGT)

Tabela 05 – Valores de γ -glutamyltransferase (U/L) de eqüinos MM hípidos obtidos de amostras submetidas a diferentes tipos de técnicas e metodologias de análise.

Grupos	Fabricantes	Y-glutamyltransferase GGT (U/L)
G1	Bioclin [®]	13,69±6,40 b
G2	Katal [®]	23,80±4,55 a
G3	In Vitro [®]	17,68±2,73 b
	Média	18,89±6,27
	CV	26,11

Médias na mesma coluna, seguidas por letras minúsculas diferentes, diferem significativamente (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Como demonstrado na tabela 05 os valores das médias para a enzima γ -glutamyltransferase (GGT) apresentaram diferença significativa (P<0,05). Os valores do G2, que representa a empresa Katal[®] apresentaram-se superiores (p<0,05) aos demais grupos, representados pela Bioclin[®] (G1) e pela In Vitro-Human[®] (G2), que não apresentaram diferença entre si. Essa diferença pode ter sido ocasionada pelas diferentes concentrações dos reagentes que constituem o kit da Katal[®], enzimas, coenzimas e substratos, citados pelos fabricantes (Instruções de uso); outra

causa poderia ter sido a presença de cor de fundo em um dos reagentes, no kit da Katal[®] alterando o valor do delta absorvância; pode ter sido devida aos diferentes volumes de reagentes e amostras sugeridos pelos fabricantes (Instruções de uso); pelas determinações utilizando várias opções de temperaturas, cada temperatura sugere a utilização de um determinado fator. Essas diferenças podem ser de grande relevância quando se considera a metodologia cinética. Outra causa que deve ser levada em consideração é o tempo que o reagente e a amostra ficaram dentro do aparelho antes da reação ocorrer. Quando analisamos os valores encontrados pelos diversos autores e os comparamos com os do presente estudo (12,62 – 25,16U/L), eles se situam dentro da faixa obtidas por HARVEY *et al.* (1984), VAN HEERDEN (1990), LOPES *et al.* (1993), DUNCAN *et al.* (1994), EADES e BOUNOUWN (1995), SKOWNORECK *et al.* (1995), CAVIGLIA (2000), BLOOD e STUDDERT (2002), RADOSTITS *et al.* (2002), BALARIN *et al.* (2004) e MESSER (1995). Mas diferem dos obtidos por CARLSON (1983), MEYER *et al.* (1995), SMITH (1996), KANEKO *et al.* (1997), MEYER e HARVEY (1998) e MUNDIM *et al.* (2002).

As diferenças existentes entre os valores obtidos no presente estudo para aqueles obtidos pelos referidos autores citados na literatura, podem ser devido a faixa etária dos animais, às metodologias utilizadas, às técnicas diferentes de mesma metodologia, ao grau de homogeneidade das amostras avaliadas, a utilização de método automático e com cálculo automático para os resultados de prova cinética e por último às concentrações dos constituintes dos reagentes.

5.5. Creatino fosfo cinase

Tabela 06 – Valores de creatino fosfo cinase (U/L) de equinos MM hípidos obtidos de amostras submetidas a diferentes tipos de técnicas e metodologias de análise.

Grupos	Fabricantes	Creatino fosfo cinaseK (U/L)
G1	Bioclin [®]	263,98±117,83 b
G2	Labtest [®]	251,52±56,78 b
G3	Katal [®]	355,10±13,33 a
	Média	290,20±87,00
	CV	26,76

Médias na mesma coluna, seguidas por letras minúsculas diferentes, diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Na presente pesquisa foi detectada diferença significativa ($P < 0,05$) nos valores das médias da creatino fosfo cinase (Tabela 06). O G3, Katal[®] apresentou valores de média superiores ($p < 0,05$) quando comparados aos valores de média dos G1 da Bioclin[®] e In Vitro-Human[®], que representa o G 2. As diferenças existentes entre os três grupos testados podem ser devidas ao fato de utilizarmos a mesma metodologia, cinética UV, mas com diferentes técnicas adaptadas pelos diversos fabricantes (instruções de uso). A técnica da Katal[®] apresentou diferença na técnica para os outros dois, o que deve ter levado a um aumento significativo dos valores de média obtidos neste grupo. O fato de se utilizar técnica diferente faz com que os cálculos para os resultados sejam diferentes. A diferença pode também ter sido ocasionada por ausência de modificações nas programações para o aparelho de automação, de acordo com o programa fornecido pelo fabricante, apesar da diferença a técnica da Katal[®] não apresentou alterações quando da sua adaptação; volumes de amostra e de reagentes diferentes; as diferentes concentrações dos constituintes de enzimas, coenzimas e substratos; aos diferentes fatores utilizados por cada uma das técnicas e pela temperatura de realização da técnica cinética. Os valores de média e a faixa de valores encontrados neste estudo (203,20–377,20U/L) foram semelhantes aos obtidos pelos diversos autores MULLEN *et al.* (1979); DUNCAN *et al.* (1994); ROSE e HODGSON (1994); EADES e BOUNOUW (1995); SKOWRONECK *et al.* (1995); FRANSCISCATO *et al.*

(2000); BLOOD e STUDDERT (2002); RADOSTITS *et al* (2002); BALARIN *et al* (2004) e RIBEIRO (2004). E diferentes daqueles encontrados por LUMSDEN *et al.* (1980); DUNCAN e PRASSE (1982); CARLSON (1983); VAN HEERDEN *et al.* (1990); MESSER (1995); MEYER *et al.* (1995); KANEKO *et al.* (1997); CAVIGLIA *et al.* (2000) e MUNDIN *et al.* (2002).

As diferenças observadas entre as citações dos diversos autores podem ter ocorrido devido à sensibilidade das técnicas atuais, que são muito mais sensíveis, com maior sensibilidade analítica, que de uma maneira geral aumentaram a quantidade de analito nas amostras analisadas e também pela utilização de fatores, fornecidos pelos fabricantes, que servem para a correção dos valores. Como a maioria dos autores não cita o método e/ou técnica empregados, a comparação de resultados fica difícil. Há uma grande variação na atividade sérica da creatino fosfocinase, segundo a literatura, isto também pode ter sido uma causa muito importante nas diferenças entre os autores.

5.6. Cloretos (Cl⁻)

Tabela 07 – Valores de cloreto (mEq/L) de eqüinos MM hígidos obtidos de amostras submetidas a diferentes tipos de metodologias e técnicas de análise.

Grupos	Fabricantes	Cloretos (Cl ⁻) (mEq/L)
G1	Bioclin	105,90±3,90 a
G2	In Vitro-Human	103,40±3,13 a
G3	Labtest	94,20±7,35 b
	Média	101,17±7,12
	CV	5,97

Médias na mesma coluna, seguidas por letras minúsculas diferentes, diferem significativamente (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Entre os eletrólitos, os valores de média para cloreto (Tabela 07) obtidos no presente estudo, foram menores (p<0,05) para o G3, representado por Labtest[®] do que os valores obtidos pelos G1, Bioclin[®] e pelo G2, In Vitro-Human[®], que praticamente não sofreram diferença entre si. Esse achado pode ter sido ocasionado pela utilização de métodos diferentes pelos fabricantes (instruções de uso). Além disso, os métodos utilizam

volumes distintos de amostras e de reagentes e a preparação do reagente de trabalho é diferente entre os três grupos. A dificuldade de se automatizar estes métodos pode ter sido a causa da diferença existente entre os três grupos. O método utilizado nos animais do G3, Labtest[®] utiliza dois reagentes no desenvolvimento de sua técnica enquanto os outros dois utilizam somente um. O grau de automação reflete a capacidade de adaptação ao aparelho de automação. A faixa de valores obtida no presente estudo (94,09–108,29 mmol/L) não é diferente das faixas de valores obtidas por LUMSDEN *et al.* (1980), DUNCAN e PRASSE (1982), VAN HEERDEN *et al.* (1990), CARLSON (1994), KANEKO *et al.* (1997), STÄMPFLI *et al.* (2001) e ALVES *et al.* (2005). A comparação com os diversos autores não pode ser feita, pois existem métodos e até mesmo técnicas diferentes daquelas utilizadas neste estudo e nem todos os autores citaram métodos e/ou técnicas empregadas

5.7. Cálcio total (iCa)

Tabela 08 – Valores de Cálcio total (iCa) (mg/dL) de eqüinos hípidos obtidos de amostras submetidas a diferentes tipos de técnicas e metodologias de análise.

Grupos	Fabricantes	Cálcio total (iCa) (mg/dL)
G1	Bioclin [®]	10,95±0,52 b
G2	In Vitro-Human [®]	11,66±0,45 a
G3	Labtest [®]	9,88±0,35 c
	Média	10,83±0,85
	CV	4,105

Médias na mesma coluna, seguidas por letras minúsculas diferentes, diferem significativamente (P<0,05) pelo teste de Tukey.

O cálcio total apresentou diferença significativa (P<0,05) entre os valores das médias dos três grupos (G2>G1>G3), In Vitro-Human[®], Bioclin[®] e Labtest[®], respectivamente. A diferença entre os grupos se deve a utilização de duas metodologias distintas, essas diferentes metodologias trazem diferenças nas concentrações dos reagentes constituintes de cada kit. Apesar das diferenças entre os valores de média dos três kits, elas não são suficientes para contemplar uma ou outra empresa, como melhor ou

pior, porque o range da diferença é pouco maior entre os três. Estas diferenças não estão fora das faixas de referência de cada um dos autores. Não se pode julgar as três técnicas devido à ausência de intervalos de referência confiáveis. As adaptações para automação fornecidas pelos fabricantes não são diferentes. Grupos monorreagentes e birreagentes fazem com que os resultados sejam diferentes, apesar das diferenças existentes entre os três grupos os valores obtidos foram semelhantes aos de MULLEN *et al.* (1979), HARVEY *et al.* (1984), VAN HEERDEN *et al.* (1990), ROSE e HODGSON (1994), KANEKO *et al.* (1997), MUNDIN *et al.* (2002) e JOHANSSON (2003), mas foram diferentes para RIBEIRO (2004). As diferenças entre o presente estudo e os autores citados se devem a metodologias diferentes utilizados pelos mesmos. Como nas variáveis anteriores a maioria dos autores não citou a metodologia utilizada (Tabela 16 e Figura 07).

5.8. Albumina (g/dL), ureia (mg/dL), creatinina (mg/dL), glicose (mg/dL), aspartato aminotransferase (AST), Bilirrubina total (BT), Magnésio (Mg⁺⁺, sódio (Na⁺) e Potássio (K⁺).

Tabela 09 – Valores de albumina (g/dL), uréia (mg/dL), creatinina (mg/dL) e glicose (mg/dL) de eqüinos MM hípidos obtidos de amostras submetidas a diferentes tipos de técnicas e metodologias de análise.

Grupos	Albumina (g/dL)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Glicose (mg/dL)
G1	2,78±0,28 a	45,59±8,83 a	1,19±0,61 a	92,00±10,26 a
G2	2,94±0,18 a	43,26±7,40 a	1,34±0,16 a	89,36±34,27 a
G3	2,93±0,31 a	42,75±8,24 a	1,24±0,27 a	95,70±27,57 a
Média	2,88±0,28	43,87±7,99	1,26±0,39	92,31±25,29
CV	9,14	18,64	31,69	28,24

Tabela 10 – Valores de aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina total (BT) e magnésio total (tMg) de equinos MM hígidos obtidos de amostras submetidas a diferentes tipos de técnicas e metodologias de análise.

Grupos	AST (U/L)	BT (mg/dL)	tMg (mg/dL)
G1	195,70±39,10 a	1,85±0,38 a	1,70±0,13 a
G2	185,00±91,20 a	1,38±0,56 a	1,19±0,36 a
G3	180,50±91,20 a	1,36±0,37 a	1,77±0,84 a
Média	187,06±7,81	1,54±0,48	1,55±0,85
CV	31,78	29,03	14,75

Tabela 11 – Valores de sódio (Na^+), potássio (K^+) de equinos MM hígidos obtidos de amostras submetidas a diferentes tipos de técnicas e metodologias de análise.

Grupos	Na^+ (mEq/L)	K^+ (mEq/L)
G1	142,20±11,25 a	3,63±0,50 a
G2	127,00±5,60 a	3,18±0,47 a
Média	134,65±11,68	3,40±0,52
CV	6,60	14,40

Com relação à albumina, glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase, magnésio total, bilirrubina total, sódio e potássio não foi observado diferença significativa entre os valores das médias entre os grupos ($P>0,05$), como demonstrado nas tabelas 09,10 e 11. Com relação esta ausência de diferença, ela se deve possivelmente à grande semelhança entre as técnicas, minimizando sobremaneira as diferenças existentes entre os grupos; a estabilidade maior dos reagentes de trabalho para estes parâmetros; ao próprio parâmetro, por ser menos sensível as variações de temperatura; a maior adaptabilidade dos parâmetros aos diversos programas desenvolvidos e fornecidos pelos fabricantes; a menor sensibilidade dos reagentes as alterações das amostras e a distribuição correta dos volumes de reagentes e amostras. Quando analisamos e comparamos os resultados obtidos com os resultados e os intervalos de referência estabelecidos pelos

diversos autores, os resultados do presente estudo encontram-se dentro dos intervalos de referência utilizados por vários autores como demonstrado na tabela de valores do apêndice A (ROSE e HODGSON (1994), KANEKO *et al.* (1997), RADOSTITS *et al.* (2002) e ALVES (2005).

6. CONCLUSÕES

Nas condições em que esta pesquisa foi realizada, conclui-se que:

1. Para as dosagens séricas de proteína total, é recomendada a utilização dos kits de Bioclin® e In Vitro-Human® pelos resultados apresentados, esta mesma recomendação não pode ser feita para o *kit* da Katal®.
2. Para a proteína C-reativa a recomendação é a utilização das metodologias representadas pela nefelometria da Beckman Coulter® e pela Imunoturbidimetria de Bioclin®, não sendo recomendada a utilização para a determinação de proteína c reativa pela metodologia de aglutinação em látex de Bioclin®.
3. Para as dosagens da enzima fosfatase alcalina, recomendamos a utilização das técnicas de Bioclin® e Katal®. Para utilização do kit da In Vitro-Human®, alguns cuidados deverão ser tomados principalmente quando for utilizar automação.
4. Nas dosagens de Y-glutamilttransferase, podem ser utilizados sem restrição em medicina veterinária os kits de Bioclin® e in Vitro-Human®, quando da utilização do kit da Katal® levar em consideração as diferenças existentes e tomar todas as providencias para que os resultados não sejam errôneos.
5. As dosagens de creatino fosfo cinase, mostraram que o kit da Katal® usado com muito cuidado, observando-se atentamente a programação fornecida e também levar em consideração que a faixa de referência deve ser alterada.
6. Para as dosagens de Cloreto, pelos resultados obtidos no presente estudo não recomendamos a utilização do método titulométrico de In Vitro-Human®, quando da necessidade de dosar este parâmetro utilizar as técnicas de Bioclin® e da Labtest®.

7. Para as dosagens de Cálcio, recomendamos a utilização de qualquer das metodologias utilizadas, visto que apesar das diferenças estatísticas, a diferença clínica praticamente inexistente entre Bioclin[®], Katal[®] e Labtest[®].
8. Não há restrição quando da utilização dos kits de albumina, bilirrubina total, sódio, potássio, magnésio, uréia, creatinina, glicose e aspartato aminotransferase para as empresas testadas no presente estudo.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao avaliarmos os resultados do experimento sugerimos:

1. A realização de estudos para estabelecer valor de referência para a proteína C-reativa em equinos, pois a mesma será de grande valor no auxílio diagnóstico nas diversas enfermidades.
2. A recomendação de outros estudos para a determinação de valores de referência condizentes com as nossas características próprias, para todos os parâmetros de bioquímica clínica.
3. Os fabricantes deveriam fazer adaptações para os aparelhos visando atender todas as espécies animais.
4. Cada laboratório deveria adotar seus valores de referência baseado na sua realidade, ou seja, levando em consideração manejo, raça, faixa etária, atividade desenvolvida pelo animal, armazenamento de amostra, aparelho e técnica/metodologia utilizados.
5. No momento da emissão do resultado laboratorial deveria ser fornecido o método e/ou técnica utilizados na execução do mesmo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.; McCLURE, J. J.; GOSSET, K. A.; KOONCE, K. L.; EZIGBO, C. Evaluation of a technique for measurement of gamma-glutamyltranspeptidase in equine urine. **Am. J. Vet. Res.**, v.46, n.1, p.147-150, 1985.

ALVES, G. E. S.; RIBEIRO-FILHO, J. D.; OLIVEIRA, H. P.; ABREU, J. M. G. Tratamentos da compactação experimental do cólon maior em eqüinos: resultados de laboratórios e exames bioquímicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, n.3, p.281-287, 2005.

ALSEMGEEST, S.P.M.; TAVERNE, M.A.M.; BOOSMAN, R.; VANDERWEYDEN, B.C.; GRUYS, E. Peripartum acute-phase protein SAA concentration in plasma of cows and fetuses. **Am. J. Vet. Res.**, v.54, p.164-167, 1993.

BACILA, M. **Bioquímica veterinária**. 2. ed. São Paulo: Robe Editorial, 2003, 583 p.

BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Editora Roca Ltda, 2007, 575 p.

BALARIN, M. R. S.; LOPES, R. S.; KOHAYAGAWA, A.; LAPOSY, C. B.; FONTEQUE, J. H. Avaliação da glicemia e da atividade sérica de aspartato aminotransferase, creatinoquinase, gama-glutamilttransferase e lactato desidrogenase em eqüinos puro sangue inglês (PSI) submetidos a exercícios de diferentes intensidades. **Semina Ciên. Agr.**, v. 26, n.2, p.211-218, 2005.

BARANOWBARANOWSKI, S.; JANKOWIAK, D.; JANUS, K.; SKRZYPCZAK, W.F. Some physiological and biochemical indices in the blood serum of cows in the perinatal period and in the blood of their calves. II. Mineral elements and alkaline phosphatase activity. **Rocz. Nauk. Roln.**, v.104, n.1, p.19-29, 1988.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Today**, v.15, p.74-80, 1994.

BECK, P. R.; SAMMONS, H. G. A stabilising factor for gamma-glutamyl transpeptidase in urine. **Clin. Chim. Acta.**, v.15, n.65, p.351-359, 1975.

BEITZ, D. C. Metabolismo dos carboidratos. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. (Ed.) **Dukes – Fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p.398-411.

BENESI, F. J.; KOGIKA, M. M. Fluidoterapia. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. (Ed.) **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1999. Cap. 54, p. 575-601.

BERGMAN, E.N. Distúrbios do metabolismo dos carboidratos e gordura. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. (Ed.) **Dukes – Fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap.27, p.447-456.

BLOOD, D. C.; STUDDERT, V. P. **Dicionário de veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 974 p.

BOOSMAN,R.; NIEWOLD, Th.A.; MUTSAERS, C.W.A.A.M.; GRUYS,E. Serum amyloid A concentrations in cows given endotoxin as acute-phase stimulant. **Am. J. Vet. Res.**, v.50, p.1690-1694, 1989.

BRAUN, J. P.; BERNARD, P.; BURGAT, V.; RICO, A. G. Gamaglutamiltransferase in domestic animals. **Vet. Res. Commun**, v.6, p.77-90, 1983.

BRAUN, J. P.; RICO, A. G.; BERNARD, P. Blood biochemistry in calf, foal and goat during the first two weeks of life. **Clin. Chem.**, v.29, n.6, p.1210-1216, 1992.

BROWNLOW, M. A.; HUTCHINS, D. R. The concept of osmolality: its use in the evaluation of “dehydration” in the horse. **Equine Vet. J.**, v.14, n.2, p.106-110, 1982.

CARDINET, G. H. Skeletal Muscle Function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Ed.) **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. New York: Academic Press,1997, Cap.16, p.407-435.

CARLSON, G. P. Testes de química clínica. In: SMITH, B. P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. São Paulo: Manole, v.1, p.395-427, 1993.

COLES, E. H. **Patologia clínica veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole,1984 566p.

COLLATOS, C.; MORRIS, D. D. Fluid therapy. In: AUER, J. A.; STICK, J. A. (Ed.) **Equine surgery**. 2. ed. Saunders Company: Philadelphia, 1999, Cap.5, p.33-39.

COOPER,E.H. Acute phase reactant proteins. **Imunol. Ser.**, v.53, p.521-536, 1990.

COPPO, J.A.; MUSSART, N.B. Apoyatura bioquímica al diagnóstico veterinário. Casuística registrada trás 25 años de funcionamiento de um servívio de análisis clínicos. **Ver. Vet.**, 10/11. 1 y 2 , 2000.

COSTA, A. P. D. **Determinação dos efeitos da desidratação experimental nos equilíbrios hidroeletrólítico e ácido-base de eqüinos.** 56 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos de Goytacazes, Rio Janeiro, 2003.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 579p.

CUTMORE, C. M.; SNOW, D. H.; NEWSHOLME, E. A. Activities of key enzymes aerobic and anaerobic metabolism in middle gluteal muscle from trained and untrained horse. **Equine Vet. J.**, v.17, n.5, p. 354-356, 1985.

DA CÁS, E.L.; BRASS, K.E.; GREIG, C.R.; DEPRA, N.M.; SILVA, C.A.M. Concentrações de creatino quinase, aspartato aminotransferase e desidrogenase láctica em potros do nascimento até aos seis meses de idade. **Ciência Rural**, v.31, n.6, p.1003-1006, 2001.

DEARO, A. C. O.; REICHMANN, P. F. Fluidoterapia em grandes animais. Parte 1: água corpórea, indicações e tipos de fluidos. **Rev. Educ. Cont. CRMV-SP**, v.4, n.3, p.3-11, 2001.

DE MORAIS, H. S. A.; DiBARTOLA, S. P. Mixed acid-base Disorders. Part I: Clinical approach. **Cont. Educ. Art.**, v.15, n.12, p.1619-1626, 1993.

DIBARTOLA, S. P. **Fluid therapy in small animal practice.** 2. Ed. Philadelphia: Saunders Company, 2006. 720p.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1 and the pathogenesis of acute-phase response. **N. Engl. J. Med.**, v.311, p.1413-1418, 1984.

DIVERS, T. J.; JOHNSTON, J. K.; REEF, V. B.; ACLAND, H. Interpretation of electrolyte abnormalities in clinical disease in the horse. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 32., 1986, Tennessee. **Proceedings...** Tennessee: AAEP, 1986, p. 69-80.

DORETTO, J. S. **Influência do tempo e da temperatura de armazenagem sobre a estabilidade de alguns constituintes do soro sangüíneo de bovinos.** 49 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 1996.

DOXEY, D.L. **Patologia clínica e métodos diagnósticos.** 2. Ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1985, 306p.

DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W. **Patologia clínica veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 217 p.

EADES, S. C.; BOUNOUW, D. I. **Laboratory profiles of equine diseases**, St. Louis: Mosby, 1997. 304 p.

ECKE, P.; HODGSON, D. R.; ROSE, R. J. Induced diarrhea in horses. Part 2: Response to administration of an oral rehydration solution. **Vet. J.**, v.155, n.2, p.161-170, 1998.

ESSEN-GUSTAVSSON, B.; KARLSTROM, K.; LINDHOLM, A. Fibre types, enzymes activities and substrate utilization in skeletal muscles of horses competing endurance rides. **Equine Vet. J.** , v.16, n.3, p. 197-202, 1984.

FENNER, W. R. **Consulta rápida em clínica veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 514 p.

FINCO, D. R. Kidney function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Ed.) **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. New York: Academic Press, 1997. Cap.17, p.441-484.

FRAPE, D. L. Diet and exercise performance in the horse. **Proc. Nutr. Soc.**, v.53, n.1, p.189-206, 1994.

FREESTONE, J. F. Fluid therapy: an integral part of treating common equine disorders. **Vet. Med.**, v.88, n.6, p.563-570, 1993.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, 2007. 198 p.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SCHEFFER, J.F.S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. Avaliação metabólico-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluídos corporais. **29º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Gramado. 2002.

GRUYS, E.; OBWOLO, M. J.; TOUSSAINT, M. J. M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. **Vet. Bull**, v.64, p.1009-1018, 1994.

GUSTAVSSON, B.; CURELARU, I.; HULTMAN E.; LINDNER L. E. Long central venous catheters – time for an evaluation. **Lakartidningen**, v.80, n.4, p.3929-3931, 1983.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 973 p.

HARVEY, J. W.; KANEKO, J. J. Glucose metabolism of mammalian erythrocytes. **J. Cell. Physiol.**, v.89, n.2, p.219-224, 1976.

HARVEY, R. B.; HAMBRIGHT, M. B.; ROWE, L. D. Clinical biochemical and hematologic values of the American miniature horse: reference values. **Am. J. Vet. Res.**, v.45, n.5, p.987-990, 1984.

HAYES, M.A. Functions of cytokines and acute phase proteins inflammation. In: **Lumsden JH (ed) VIth Congress of the ICACB Proceedings**, Guelph, Canadá, p.1-7, 1994.

HENDRIX, C. M. **Procedimentos laboratoriais para técnicos veterinários**. 4. ed, São Paulo: Roca, 2005. 556p.

HIRVONEN, J.; PYÖRÄLÄ, S.; HEINÄSUO, A.; JOUSIMIES-SOMER, H. Penicillin G and penicillin G-tinidazole treatment of experimentally induced summer mastitis – effect on elimination rates of bacteria and outcome of the disease. **Vet. Microbiol.**, v.42, p.307-315, 1994.

HODGSON, D. R.; ROSE, R. J. Effects of a nine-month endurance training programme on muscle composition in the horse. **Vet. Rec.**, v.121, n.12, p.271-274, 1987.

HOUSTON, D. M.; RADOSTITS, O. M. O exame clínico. In: RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, I. G. J.; HOUSTON, D. M. **Exame clínico diagnóstico em veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. Cap.6, p.81.

JAIN, N.C. **Shalm's of veterinary hematology**. 4. Ed. Lea & Febiger: Philadelphia, 1993, 1221p.

JOHNSON, P. J. Electrolyte and acid-base disturbance in the horse. **Vet.Clin. North. Am. Equine Pract.**, v.11, n.3, p.491-512, 1995.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**, 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.

KLEIN, K. A.; CLARK, C.; ALLEN, A. L. Hypoglycemia in sick and moribund farmed elk calves. **Canadian Veterinary Journal**, v. 43, n. 10, p. 778-781, 2002.

KLINE, K. H.; BECHTEL, P. J. Changes in the metabolic profile of equine *Gluteus medius* as a function of sampling depth. **Comp. Biochem. Physiol. A.**, v.91, n.4, p.815-819, 1988.

KOJ, A. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. **Biochim Biophys Acta**, v.1317, p.84-94, 1996.

KRAMER, J. W.; HOFFMANN, W. E. Clinical enzymology. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Ed.) **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. New York: Academic Press, 1997. Cap.12, p.303-323.

KUSHNER, I. The phenomenon of the acute phase response. **Ann.N.Y. Acad. Sci.**, v.389, p. 39-48, 1982.

KUSHNER,I.;MACKIEWICZ,A. Acute phase proteins as disease markers. **Disease Markers**, v.5, p.1-11, 1987.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 725 p.

LEHNINGER, A. L. Glicólise: a via central do catabolismo da glicose. In: _____. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1986. p.287-310.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M.. **Princípios de bioquímica**. 2. Ed., São Paulo: Sarvier, 1975. 805.

LIMA E SILVA, R.; BORTOLOZZI, J.; RAMOS, P. R. R.; DIERCKX, S. M. Polimorfismo genético-bioquímico de enzimas em éguas da raça mangalarga. **Arch. Latinoam. Prod. Anim.**, v.10, n.3, p.149- 152, 2002.

LIMA, O.A.; SOARES, B.J.; GRECO, J.B.; CANÇADO, R.J. **Métodos de laboratório aplicados à clínica técnica e interpretação**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985. 608 p.

LINDNER, A.; BAUER, S. Effect of temperature, duration of storage and sampling procedure on ammonia concentration in equine blood plasma. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v.31, n.7, p.473-476, 1993.

LÖFSTEDT, J.; COLLATOS, C. Creatinekinase and aspartate aminotransferase concentrations. **Vet. Clin. North. Am. Equine Pract.**, Philadelphia, v.3, n.1, p.145-168, 1997.

LOPES, S. T. A.; KRAUSE, A.; COSTA, P. R. S. Determinação dos valores médios das enzimas AST, LDH, GGT e FA no soro de eqüinos sadios em Santa Maria, RS. **Ciên. Anim.**, v.23, n.3, p.301-303, 1993.

LUNA, S. P. L. Interpretação de exames laboratoriais. In: THOMASSIAN, A.; MACORIS, D. G.; ALVES, G. E. S.; SILVA, L. C. L. C.; JÚNIOR, P. V. M.; LUNA, S. P. L. (Ed.) **Diagnóstico em cólica eqüina**. I Fórum de Gastroenterologia Eqüina, 1, 1994. Curitiba, PR., p. 38-48, 1994.

LUMSDEN, J.H.;ROWE, R.;MULLEN,K. Haematology and biochemistry reference values for the light horse. **Canadian Journal of comparative Medicine**, v.44, p.32-42, 1980.

MESSER, N. T. The use of laboratory tests in equine practice. **Vet. Clin. Pathol.**, v.11, n.3, p.345-350, 1995.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinária: interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995. 308p.

MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. Laboratory medicine testing: specimen interferences and clinical enzymology. In: MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. (Ed.) **Veterinary laboratory medicine: interpretation and diagnosis**. Philadelphia: Saunders, 1998. Cap.1, p. 3-21.

MICHELL, A. R. Understanding fluid therapy. **Arish. Vet. J.**, v.37, n.1, p.94-103, 1983.

MILLER, O.; GONÇALVES, R.R. **Laboratório para o clínico**. 8. Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1999. 607 p.

MUNDIM, A. V.; TEIXEIRA, A. A.; GALO, J. A.; CARVALHO, F. S. R. Perfil bioquímico e osmolalidade sanguínea de equinos utilizados para trabalho em centros urbanos. **Biosci. J.**, v.20, n.1, p.135-142, 2004.

NAKAGAWATOSA, N.; MORIMATSU, M.; KAWASAKI, M.; NAKATSUJI, H.; SYUTO, B.;SAITO, M. Stimulation of haptoglobin synthesis by interleukin-6 and tumor necrosis factor, but not by interleukin-1, in bovine primary cultured hepatocytes. **J. Vet. Med. Sci.**, v.57, p.219-223, 1995.

O'NEILL, S. L.; FELDMAN, B. F. Hemolysis as a factor in clinical chemistry and hematology of the dog. **Vet. Clin. Pathol.**, v.18, n.3, p.58-68, 1989.

OLSON, N.C.;HELLEYER, P.W.; DODAM, J.R. Mediators and vascular effects in response to endotoxin. **Br. Vet. J.**, v.151, p.489-522, 1995.

ONO, T.; KITAGUCHI, K.; TAKEHARA, M.; SHIIBA, M.; HAYAMI, K. Serum-constituents analyses: effect of duration and temperature of storage of clotted blood. **Clin Chem**, v. 27, n.1, p. 35-38, 1981.

PAAPE, M.J.; CAPUCO, A.V. Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats. **J. Anim. Sci.**, v.75, p.556-565, 1997.

PANNEN, B.H.J.; ROBOTHAM, J.L. The acute phase response. **New Horiz.** V.3, p.183-197, 1995.

PINSENT, P. J. N.; EDDY, R. G. Diagnosis and diferencial diagnosis in the cow. In: ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDY, R. G. **Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle**. London: Blackwell Sci., Cap. 11, p. 135-157, 2004.

PYÖRÄLÄ, S., KAARTINEN, L.; KÄCK, H. Efficacy of two therapy regimes for treatment of experimentally induced *Escherichi coli* mastitis in cows. **J. Dairy Sci.**, V.77, p.453-461, 1994.

RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, I. G.; HOUSTON, D. M. **Exame clínico e diagnóstico em veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 591 p.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia animal**. 4. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000. Cap. 15, p. 611-612.

RAYNES, J.G. The acute phase response. **Biochem.Soc.Transact.**, v.22, 1994, p.69-74, 1994.

RIBEIRO FILHO, J. D. **Tratamento da compactação experimental do cólon maior de eqüinos com sene, fluidoterapia enteral e parenteral**. 130 f. Tese (Doutorado em Patologia e Ciências Clínicas) –Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2003.

RIVERO, J. L. L.; SERRANO, A. L.; HENCKEL, P. Perfil bioquímico del músculo Gluteus medius en eqüinos con distinto historial en carreras de resistência. **Arch Méd Vet**, v.30, n.1, p.23-30, 1998.

ROSE, R. J.; HODGSON, D. R. Hematology and biochemistry In: _____. **The athletic horse**. Philadelphia: Saunders Company, 1994. Cap. 2, p. 63-78.

ROSE, R. J.; ALLEN, J. R.; HODGSON, D. R.; STEWART, J. H. Responses to submaximal treadmill exercise in the horses: Changes in hematology, arterial blood gas and acid base measurements, plasma biochemical values and heart rate. **Vet. Rec.**, v.113, n.26-27, p.612-618, 1983.

ROSE, R. J. A physiological approach to fluid and electrolyte therapy in the horse. **Equine. Vet. J.**, v.3, n.1, p.7-14, 1981.

SARIKAPUTU,M.; MORIMATSU,M; YAMAMOTO,S.; SUYTO,B.; SAITO,M.; NAIK,M. Lattex agglutination test: a simple rapid and practical method for bovine serum CRP determination. **Jpn. J. Vet.**, Res. V.40, p.1-12, 1992.

SARTOR, F. I.; JACOBSON, R. G. S.; KOHAYAGAWA, A.; MACHADO, M. A.; CURI, P. S. Determinações bioquímicas de fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase, alamina aminotransferase, proteínas totais, albumina e bilirrubina total e direta no soro de eqüinos da raça quarto de milha. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.37, n.3, p.229-239, 1985.

SCHALM, O. W.; JAIN, N. C.; CARROLL, E. J. **Veterinary hematology**. 3. ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1975. 807 p.

SCHALM, O. W. Equine hematology. III. Significance of plasma fibrinogen concentration in clinical disorders in horses. **Equine Pract.**, v.1, n.1, p.24-25, 1979.

SCHEFFER, J. F.; GONZÁLEZ, F. H. D. **Enzimologia clínica em medicina veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/bioquimica>>. Acesso em: 25 outubro de 2007.

SCOTT,P.R.; MURRAY,L.D; PENNY,C.D. A preliminary study of serum haptoglobin concentration as a prognostic indicator of ovine dystocia cases. **Br. Vet. J.**, v.148, p.351-355, 1992.

SICILIANO,P. D.; LAWRENCE,L. M.; DANIELSEN,K.; POWELL,D. M.; THOMPSON,K. N. Effect of conditioning and exercise type on serum creatinekinase and aspartate aminotransferase activity. **Equine Vet. J.**, Suppl. 18, p. 243-247, 1995.

SPINHA DE TOLEDO, P.; DOMINGUES JÚNIOR, M.; FERNANDES, W. R.; MAGONE, M. Atividade sérica de aspartato aminotransferase, creatinoquinase, gama-glutamyl transferase, lactato desidrogenase e glicemia de cavalos da raça PSI submetidos a exercícios de diferentes intensidades. **Rev. Bras. Ciên. Vet.**, v. 8, n. 2, p. 73-77, 2001.

STÄMPFLI,H.R.; CARLSON,G.P. How to use the routine serum biochemical profile to understand and interpret Acid-Base disorders in the horse. **AAEP PROCEEDINGS.**, v.47, p. 257-261, 2001.

STADNYK,A.W.; GAULDIE,J. The acute phaseprotein response during parasitic infection. **Parasitol. Today**, v.7, p.7-12, 1991.

STEEL,D.M.; WHITEHEAD,A.S. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. **Today** v.15, p.81-88, 1994.

STEWART, P. A. Modern quantitative acid-base chemistry. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.61, n.12, p.1444-1461, 1983.

STEWART, R. H. Considerations in fluid and electrolyte therapy In: __; REED, S. M.; BAYLY, W. M. (Ed.) **Equine internal medicine**. Philadelphia: Saunders, 1998. Cap. 4, p. 192-198.

STOCKHAM, S. L. Interpretation of equine serum biochemical profile results. **Vet. Clin. North. Am. Equine. Pract.**, v.11, n.3, p.391-414, 1995.

STOKKE, O. Preservation of gamma-glutamyl transpeptidase activity in human urine. **Clin. Chim. Acta.**, v.57, n. 2, p. 143-148, 1974.

SWENSON, M. J.; REECE, W.O.(Ed.) **Dukes** – Fisiologia dos animais domésticos. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 856 p.

TABEL, H. Alternative pathway of complement in ruminants: role in infection. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, V.54, p.17-121, 1996.

TASKER, J. B. Fluids, electrolytes and acid-base balance. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Ed.) **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. New York: Academic Press, 1997. Cap. 17, p. 441-484.

TAYLOR, F. G. R.; HILLYER, M. H. **Diagnostic techniques in equine medicine**. 1. ed. Philadelphia: Saunders, 1997. 348 p.

THOMPSON, D.; MILFORD-WARD, A.;WHICHER, J.T. The value of acute phase protein measurements in clinical practice. **Ann. Clin. Biochem.**, v.29, p.122-131, 1992.

THOMPSON, J. C.; PAULI, J. V. Colostral transfer of glutamyltranspeptidase in calves. **N. Z. Vet. J.**, v.29, n.1, p.223-226, 1992.

XIMENES, L. A.; SBERNARDORI, U.; ZEDDA, L. A. Indagine su costanti ematochimiche di equine anglo-arabo-sarde. **La Clinica Veterinaria**, v.107, n.2, p.49-51, 1984.

YAMAMOTO, M.; KATOH, N.;ADCHI, Y. The presence of two low molecular mass proteins immunologically related to 14 kilodalton serum amyloid A in the lipoprotein fraction and their decreased serum concentrations in calves with experimentally induce pneumonia. **J. Vet. Med. Sci.**, v.60, p.181-187, 1998.

WEAVER, A.D. Lameness above the foot. In: ANDREWS, A.H.; BLOWEY, R.W.; BOYD, H.; EDDY, R.G. **Bovine medicine: Diseases and husbandry of cattle**. London: Blacwell, 2004, cap. 31, p. 435-467.

ZALOGA, G. P.; WILKENS, R.; TOURVILLE, J.; WOOD, D.; KLYME, D. M. A simple method for determining physiologically active calcium and magnesium concentrations in critically ill patients. (Zaloga, R.Wilkens, Tourville, Wood, & Klyme, 1987) **Crit. Care. Med.**, v.15, n.9, p.813-816, 1987.

ZHANG, D. J.; ELSWICK, R. K.; MILLER, W. G.; BAILEY, J. L. Effect of serum-clot contact time on clinical chemistry laboratory results. **Clin. Chem.**, v.44, n.6, p.1325-1333, 1998.

APÊNDICE A

Tabela 16 – Métodos analíticos utilizados nas análises dos constituintes sangüíneos

Constituinte (unid.)	Método	Fabricante
PPT (g/dL)	Biureto	Bioclin®
PPT (g/dL)	Biureto	Katal®
PPT (g/dL)	Biureto	Human®
Albumina (g/dL)	Verde de Bromocresol–VCB	Bioclin®
Albumina (g/dL)	Verde de Bromocresol-VBC	Katal®
Albumina (g/dL)	Verde de Bromocresol-VBC	Human®
PCR	Aglutinação Látex	Bioclin®
PCR	Imunoturbidimetria	Bioclin®
PCR	Nefelometria	Beckman Coulter®
Sódio	Fotometria Chama	Padrão Celm®
Sódio	Íon Eletrodo Seletivo	Corning®
Potássio	Fotometria Chama	Padrão Celm®
Potássio	Íon Eletrodo Seletivo	Corning®
Cloretos	Colorimétrico	Bioclin®
Cloretos	Colorimétrico	Labtest®
Cloretos	Titulométrico/color	Human®
Glicose	Enzimática –GOD	Bioclin®
Glicose	Enzimática – GOD	Katal®
Glicose	Enzimática – GOD	Human®
Bilirrubina Total	Colorimétrica	Bioclin®
Bilirrubina Total	Colorimétrica	Katal®
Bilirrubina Total	Colorimétrica	Human®
CK	Cinética	Bioclin®
CK	Cinética	Human®
CK	Cinética	Katal®

Constituinte (unid.)	Método	Fabricante
Fosfatase alcalina	Cinética – IFCC	Bioclin®
Fosfatase alcalina	Cinética – Roy mod.	Human®
Fosfatase alcalina	Cinética – DGKC	Katal®
GGT	Cinética – Szasz	Bioclin®
GGT	Cinética -	Katal®
GGT	Cinético – colorim	Human®
Ureia	Cinética UV	Bioclin®
Ureia	Cinética UV	Human®
Ureia	Cinética UV	Katal®
Creatinina	Cinética	Bioclin®
Creatinina	Cinética	Human®
Creatinina	Cinética	Katal®
AST	Cinética	Bioclin®
AST	Cinética	Human®
AST	Cinética	Katal®
Cálcio Total	Arsenazo III	Bioclin®
Cálcio total	Cresolftaleína – color	Katal®
Cálcio total	Cresolftaleína – color	Human®
Magnésio Total	Colorimétrico	Bioclin®
Magnésio Total	Colormétrico	Human®
Magnésio Total	Colorimétrico	Katal®

APÊNDICE B

Tabela 17 – Valores de referência dos constituintes sanguíneos de Proteínas totais (PPT) (g/dL) de outros autores

Autores	Parâmetros	Média	Limite Inferior	Limite Superior
Duncan e Prasse (1982)	Proteínas totais	6,42	5,00	7,9
Carlson (1983)	Proteínas totais	6,8	5,7	7,9
Van Heerden et al. (1990)	Proteínas Totais	6,1	5,5	6,7
Meyer et al. (1995)	Proteínas Totais	6,55	5,2	7,9
Meyer et al. (1995)	Proteínas Totais	6,55	5,2	7,9
Messer (1995)	Proteínas Totais	6,65	5,6	7,5
Skowroneck et al. (1995)	Proteínas Totais	5,75	4,6	6,9
Smith (1996)	Proteínas Totais	6,8	5,7	7,9
Eades e Bounow (1997)	Proteínas Totais	6,6	5,6	7,6
Kaneko et al. (1997)	Proteínas Totais	6,55	5,20	7,90
Caviglia et al. (2000)	Proteínas Totais	6,31	5,98	6,64
Blood e studdert (2002)	Proteínas Totais	6,85	6,0	7,7
Mundin et al. (2002)	Proteínas Totais	7,67	6,67	8,67
Leme, F.O.P. (2004)	Proteínas Totais	7,1	5,2	9,0
Veiga et al. (g) (2004)	Proteínas Totais	8,38	8,0	10,0
Veiga et al. (2004)	Proteínas Totais	8,15	7,2	10,1
Alves, G.E.S. (2005)	Proteínas Totais	7,3	6,7	7,9
Santos, P.V. (2005)	Proteínas Totais	6,01	5,31	6,71
Amplitude		6,81	4,6	10,1

Tabela 18 – Valores de referência dos constituintes sangüíneos de albumina (ALB) (g/dL) de outros autores

<i>Autores</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Média</i>	<i>Limite Inferior</i>	<i>Limite Superior</i>
Carlson (1983)	Albumina	3,1	2,3	3,9
Coles (1984)	Albumina	2,60	--	--*
Meyer et al. (1995)	Albumina	3,15	2,6	3,7
Skowroneck et al. (1995)	Albumina	3,35	2,5	4,2
Smith (1996)	Albumina	3,1	2,3	3,9
Eades e Bounouw (1997)	Albumina	3,35	2,6	4,1
Kaneko et al. (1997)	Albumina	3,15	2,6	3,7
Blood e Studdert (2002)	Albumina	3,35	2,9	3,8
Meyer et al. (2002)	Albumina	3,35	2,9	3,8
Radosits et al. (2002)	Albumina	3,35	2,9	3,8
Leme, F.O.P. (2004)	Albumina	3,3	2,0	4,6
Amplitude		3,2	2,0	4,7

- Não houve citação para os limites Inferior e superior

Tabela 19 – Valores de referência dos constituintes sanguíneos de Ureia (UR) (mg/dL) de outros autores

Autores	Parâmetros	Média	Limite Inferior	Limite Superior
Lumdsen et al. (1980)	Ureia	11,7	10,0	13,4
Carlson (1983)	Ureia	17,0	10,0	24,0
Coles (1984)	Ureia	15,0	10,0	20,0
Rose e Hodgson (1994)	Ureia	26,0	24,0	48,0
Meyer et al. (1995)	Ureia	17,0	10,0	24,0
Skownoreck et al. (1995)	Ureia	17,5	8,0	27,0
Smith (1996)	Ureia	17,0	10,0	24,0
Eades e Bounouw (1997)	Ureia	14,0	11,0	27,0
Kaneko et al. (1997)	Ureia	17,0	10,0	24,0
Dittrich, R.L. (1998)	Ureia	24,15	--	--*
Blood e Studdert (2002)	Ureia	15,0	10,0	30,0
Alves, G.S.E. (2004)	Ureia	21,2	14,4	28,0
Mullen et al. (2004)	Ureia	27,6	22,4	32,8
Leme F.O.P. (2004)	Ureia	33,56	22,5	45,2
Mullen et al. (2004)	Ureia	18,8	14,0	23,6
Ribeiro et al. (2004)	Ureia	35,0	15,0	55,0
Johansson, A.M. (2005)	Ureia	18,0	19,0	36,0
Neves et al. (2005)	Ureia	33,02	24,81	41,23
Santos, P.V. (2006)	Ureia	6,50	2,58	7,42
Amplitude		19,56	8,00	55,0

- Não houve citação nos limites inferior e superior

Tabela 20 – Valores de referência dos constituintes sanguíneos de creatinina (CREAT) (mg/dL) de outros autores

<i>Autores</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Média</i>	<i>Limite Inferior</i>	<i>Limite Superior</i>
Carlson (1983)	Creatinina	1,55	1,2	1,9
Coles (1984)	Creatinina	1,45	1,0	1,9
Rose e Hodgson (1994)	Creatinina	1,45	1,1	1,8
Meyer et al. (1995)	Creatinina	1,55	1,2	1,9
Skowroneck et al. (1995)	Creatinina	1,2	0,6	1,9
Smith (1996)	Creatinina	1,55	1,2	1,9
Eades e Bounouw (1997)	Creatinina	1,3	0,4	2,2
Kaneko et al. (1997)	Creatinina	1,55	1,2	1,9
Radosits et al. (2002)	Creatinina	1,4	0,9	1,9
Blood e Studdert (2002)	Creatinina	1,55	1,2	1,9
Alves, G.S.E. (2004)	Creatinina	0,70	0,32	1,08
Leme, F.O.P. (2004)	Creatinina	1,7	1,2	2,2
Ribeiro et al. (2004)	Creatinina	2,3	1,5	3,1
Neves, M. et al. (2005)	Creatinina	1,49	1,12	1,86
Amplitude		1,48	0,40	2,2

Tabela 21 – Valores de referência dos constituintes sanguíneos de Bilirrubina total (BT) (mg/dL) de outros autores

<i>Autores</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Média</i>	<i>Limite Inferior</i>	<i>Limite Superior</i>
Carlson (1983)	Bilirrubina total	1,0	0	2,0
Coles (1984)	Bilirrubina total	1,44	0,81	2,07
Meyer et al. (1995)	Bilirrubina total	1,0	0	2,0
Eades e Bounouw (1997)	Bilirrubina total	1,6	0	3,2
Blood e Studdert (2002)	Bilirrubina total	3,1	0,2	6,0
Radosits et al. (2002)	Bilirrubina total	1,5	1,0	3,0
Macedo, M.F. (2006)	Bilirrubina Total	1,1	0,2	2,0
Amplitude		1,53	0	6,00

Tabela 22 – Valores de referência dos constituintes sanguíneos de glicose (GLI) (mg/dL) de outros autores

<i>Autores</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Média</i>	<i>Limite Inferior</i>	<i>Limite Superior</i>
Mullen et al. (1979)	Glicose	83,4	67,2	99,6
Mullen et al. (1979)	Glicose	45,21	20,9	69,3
Lumdsen et al. (1980)	Glicose	4,5	3,5	5,5
Carlson (1983)	Glicose	95,0	75,0	115,0
Coles (1984)	Glicose	83,0	66,0	100,0
Rose e Hodgson (1984)	Glicose	105,0	70,0	140,0
Meyer et al. (1995)	Glicose	95,0	75,0	115,0
Smith (1996)	Glicose	95,0	75,00	115,0
Eades e Bounouw (1997)	Glicose	98,0	62,0	134,0
Kaneko et al. (1997)	Glicose	95,00	75,00	115,0
Dittrich, R.L. (1998)	Glicose	115,0	--	--*
Blood e Studdert (2002)	Glicose	83,0	66,0	100,0
Radosits et al. (2002)	Glicose	95,0	75,0	115,0
Balarin et al. (g) (2004)	Glicose	95,97	80,45	111,49
Balarin et al. (T) (2004)	Glicose	98,98	79,06	118,90
Balarin et al. (r) (2004)	Glicose	101,6	87,04	116,16
Leme, F.O.P. (2004)	Glicose	74,85	61,0	88,7
Ribeiro, C.R. (2004)	Glicose	70,5	51,1	89,9
Alves, G.E.S. (2005)	Glicose	83,2	66,8	99,6
Amplitude			20,9	140,0

- Não houve citação para os valores dos limites Inferior e superior

Tabela 23 – Valores de referência dos constituintes sanguíneos de Sódio (Na⁺) de outros autores

<i>Autores</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Média</i>	<i>Limite Inferior</i>	<i>Limite Superior</i>
Lumdsen et al. (1980)	Sódio	140,0	137,0	143,0
Carlson (1983)	Sódio	139,0	132,0	146,0
Coles (1984)	Sódio	139,0	132,0	146,0
Rose e Hodgson (1984)	Sódio	138,5	133,0	144,0
Meyer et al. (1995)	Sódio	139,0	132,0	146,0
Eades e Bounouw (1997)	Sódio	135,0	128,0	142,0
Blood e Studdert (2002)	Sódio	141,0	132,0	150,0
Radosits et al. (2002)	Sódio	139,0	132,0	146,0
Ribeiro, C.R. (2004)	Sódio	139,3	133,5	145,1
Santos, P.V. (2004)	Sódio	136,29	129,17	143,41
Alves, G.S.E. (2005)	Sódio	144,4	138,2	150,6
Johansson, A.M. (2005)	Sódio	141,5	141,0	142,0
Amplitude		139,33	121,40	153,45

Tabela 24 – Valores de referência dos constituintes sanguíneos de potássio (K⁺) (mEq/L) de outros autores

Autores	Parâmetros	Média	Limite Inferior	Limite Superior
Mullen et al. (1979)	Potássio	3,7	2,5	4,9
Mullen et al. (1979)	Potássio	5,0	4,4	5,6
Lumdsen et al. (1980)	Potássio	3,6	2,8	4,4
Carlson (1983)	Potássio	3,55	2,4	4,7
Coles (1984)	Potássio	3,55	2,4	4,7
Meyer et al. (1994)	Potássio	3,55	2,4	4,7
Rose e Hodgson (1994)	Potássio	3,7	3,2	4,2
Eades e Bounouw (1997)	Potássio	3,75	2,9	4,6
Blood e Studdert (2002)	Potássio	4,0	3,0	5,0
Radosits et al. (2002)	Potássio	4,0	3,0	5,0
Johansson, A.M. (2003)	Potássio	3,75	3,7	3,8
Ribeiro, C.R. (2004)	Potássio	4,6	4,0	5,2
Alves, G.S.E. (2005)	Potássio	4,3	3,3	5,3
Santos, P.V. (2005)	Potássio	3,55	2,97	4,13
Amplitude			2,4	5,6

Tabela 25 – Valores de referência dos constituintes sanguíneos de cloretos (Cl) (mEq/L) de outros autores

<i>Autores</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Média</i>	<i>Limite Inferior</i>	<i>Limite Superior</i>
Dunca e Prasse (1982)	Cloretos	104,0	99,0	109,0
Lumdsen et al. (1980)	Cloretos	99,5	94,00	106,0
Carlson (1984)	Cloretos	104,0	99,0	109,0
Coles (1984)	Cloretos	104,0	99,0	109,0
Eades e Bounouw (1997)	Cloretos	103,50	98,0	109,0
Radosits et al. (1999)	Cloretos	104,0	98,0	110,0
Blood e Studdert (2002)	Cloretos	103,50	98,0	109,0
Alves et al. (2004)	Cloretos	106,0	101,0	111,0
Alves, G.S.E. (2005)	Cloretos	106,0	101,0	111,0
Amplitude		100,14	94,0	109,0

Tabela 26 – Valores de referência dos constituintes sanguíneos de Fosfatase alcalina (AFL) (U/L) de outros autores

<i>Autores</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Média</i>	<i>Limite Inferior</i>	<i>Limite Superior</i>
Carlson (1983)	Fosfatase alcalina	269,0	143,0	395,0
Coles (1984)	Fosfatase alcalina	158,0	97,0	209,0
Meyer et al. (1995)	Fosfatase alcalina	269,0	143,0	395,0
Skowroneck et al. (1995)	Fosfatase alcalina	212,0	109,0	315,0
Smith (1996)	Fosfatase alcalina	190,5	86,0	295,0
Kaneko et al. (1997)	Fosfatase alcalina	269,0	143,0	395,0
Blood e Studdert (2002)	Fosfatase alcalina	183,0	83,0	283,0
Radosits et al. (2002)	Fosfatase alcalina	270,0	140,0	400,0
Leme, F.O.P. (2004)	Fosfatase alcalina	116,25	104,0	128,5
Santos, P.V. (2006)	Fosfatase alcalina	109,53	41,57	177,49
Amplitude		204,63	70,00	486,05

Tabela 27 – Valores de referência dos constituintes sanguíneos de gamma glutamiltransferase (GGT) (U/L) de outros autores

<i>Autores</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Média</i>	<i>Limite Inferior</i>	<i>Limite Superior</i>
Carlson (1983)	Gamma GT	8,5	4,0	13,0
Duncan et al. (1994)	Gamma GT	19,0	6,0	32,0
Meyer et al. (1995)	Gamma GT	8,7	4,0	13,40
Skowroneck et al. (1995)	Gamma GT	28,5	12,0	45,0
Smith (1996)	Gamma GT	15,0	8,0	22,0
Eades e Bounouw (1997)	Gamma GT	19,0	6,0	32,0
Kaneko et al. (1997)	Gamma GT	8,85	4,30	13,4
Meyer e Harvey (1998)	Gamma GT	17,0	9,0	25,0
Blood e Studdert (2002)	Gamma GT	22,5	11,0	44,0
Radosits et al. (2002)	Gamma GT	24,0	4,00	44,00
Balarin et al. (T) (2004)	Gamma GT	11,85	6,75	16,95
Balarin et al. (g) (2004)	Gamma GT	26,65	9,85	43,45
Balarin et al. (T) (2004)	Gamma GT	27,94	11,12	44,76
Leme, F.O.P. (2004)	Gamma GT	21,6	16,5	26,7
Amplitude		18,51	4,00	45,00

Tabela 28 – Valores de referência dos constituintes sanguíneos de aspartato aminotransferase (AST) (U/L) de outros autores

Autores	Parâmetros	Média	Limite Inferior	Limite Superior
Mullen et al. (1979)	AST	102,0	60,4	143,6
Mullen et al. (1979)	AST	253,0	98,0	408,0
Lumdsen et al. (1980)	AST	217,0	77,0	357,0
Carlson (1983)	AST	296,0	226,0	366,0
Coles (1984)	AST	158,0	121,0	195,0
Rose e Hodgson (1984)	AST	275,0	150,0	400,0
Duncan et al. (1994)	AST	286,0	160,0	412,0
Meyer et al. (1995)	AST	296,0	226,0	366,0
Skowroneck et al. (1995)	AST	380,0	205,0	555,0
Smith (1996)	AST	273,5	138,0	409,0
Eades e Bounouw (1997)	AST	286,0	160,0	412,0
Kaneko et al. (1997)	AST	296,0	226,0	366,0
Dittrich et al. (1998)	AST	84,45	--	--*
Meyer e Harvey (1998)	AST	223,0	152,0	294,0
Franciscato et al. (2000)	AST	199,6	105,46	293,86
Blood e Studdert (2002)	AST	282,00	153,0	411,0
Radosits et al. (2002)	AST	410,0	220,0	600,0
Balarin et al. (g) (2004)	AST	188,46	75,18	301,74
Balarin et al. (t) (2004)	AST	141,02	96,96	185,08
Balarin et al. (t) (2004)	AST	244,23	169,19	319,27
Leme, F.O.P. (2004)	AST	280,9	235,2	326,6
Ribeiro, C.R. (2004)	AST	284,20	189,60	378,80
Santos, P.V.(2006)	AST	144,53	37,93	251,13
Amplitude		243,52	75,18	600,00

- Não houve citação para os valores dos limites inferior e superior

Tabela 29 – Valores de referência dos constituintes sanguíneos creatino fosfocinase (CK) (U/L) de outros autores

Autores	Parâmetros	Média	Limite Inferior	Limite Superior
Mullen et al. (1979)	CK	120,3	-21,6	262,20
Lumdsen et al. (1980)	CK	38,7	-41,3	118,7
Carlson (1983)	CK	12,90	2,4	23,4
Duncan et al. (1994)	CK	195,0	60,0	330,0
Rose e Hodgson (1994)	CK	200,0	100,0	300,0
Meyer et al. (1995)	CK	113,0	86,0	140,0
Skowroneck et al. (1995)	CK	327,5	90,0	565,0
Smith (1996)	CK	203,0	119,0	287,0
Eades e Bounouw (1997)	CK	195,0	60,0	330,0
Kaneko et al. (1997)	CK	12,9	2,4	23,4
Dittrich et al. (1998)	CK	118,01	--	--*
Meyer e Harvey (1998)	CK	123,0	113,0	133,0
Fransciscato et al. (2000)	CK	242,94	20,44	465,44
Blood e Studdert (2002)	CK	199,50	92,0	307,0
Radosits et al. (2002)	CK	262,50	145,0	380,0
Balarin et al. (g) (2004)	CK	255,62	-60,26	571,50
Balarin et al. (t) (2004)	CK	185,37	105,97	264,77
Balarin et al. (T) (2004)	CK	183,82	139,62	228,02
Leme, F.O.P. (2004)	CK	194,35	79,2	309,5
Ribeiro, C.R. (2004)	CK	390,7	176,9	464,50
Santos, P.V. (2006)	CK	64,35	31,87	96,85
Amplitude		173,26	20,44	571,50

- Não houve citação dos valores dos limites inferior e superior

Tabela 30 – Valores de referência dos constituintes sanguíneos de cálcio total (iCa) (mg/dL) de outros autores

<i>Autores</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Média</i>	<i>Limite Inferior</i>	<i>Limite Superior</i>
Mullen et al. (1979)	Cálcio	13,6	12,4	14,8
Mullen et al. (1979)	Cálcio	15,1	13,7	16,5
Lumdsen et al. (1980)	Cálcio(mmol/L)	3,0	2,8	3,2
Rose e Hodgson (1994)	Cálcio	12,0	10,8	13,2
Johansson, A.M. (2003)	Cálcio	12,05	11,90	12,2
Mundin et al. (2004)	Cálcio	10,01	9,18	10,84
Ribeiro, C.R. (2004)	Cálcio	6,2	4,6	7,8
Amplitude		11,37	4,6	14,80

Tabela 31 – Valores de referência dos constituintes sanguíneos de Magnésio total (Mg) (mg/dL) de outros autores

<i>Autores</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Média</i>	<i>Limite Inferior</i>	<i>Limite Superior</i>
Carlson (1983)	Magnésio	2,5	2,2	2,8
Coles (1984)	Magnésio	2,45	2,08	2,82
Eades e Bounouw (1997)	Magnésio	1,85	1,4	2,3
Blood e Studdert (2002)	Magnésio	2,15	1,8	2,5
Radosits et al. (2002)	Magnésio	2,5	2,2	2,8
Johansson, A.M. (2003)	Magnésio	1,9	1,8	2,0
Alves, G.S.E. (2004)	Magnésio	1,0	0,8	1,2
Amplitude		2,08	0,80	2,82

APÊNDICE C

1. Constituição dos reagentes utilizados por técnica/Metodologia, preparação do reagente de trabalho e cálculos dos resultados

1.2. Proteínas totais

1.2.1. Técnica do biureto da Bioclin®

Reagente número 1 – Padrão

Albumina 4g/dL

Azida sódica 15,38 mmol/L

Reagente número 2 – Reagente de biureto estoque

Hidróxido de sódio 2 mol/L

Tartarato de sódio e potássio 320 mmol/L

Sulfato de cobre 120 mmol/L

Iodeto de potássio 60 mmol/L

Solução de trabalho

Transferir o conteúdo do frasco número 1 para um balão contendo 450 ml de água → diluindo 1:10 .

Utilização de amostras e solução de trabalho

2,5 mL da solução de trabalho

50 µL ml da amostra

Reação de ponto final com fator para o cálculo

1.2.2. Técnica do biureto da Katal®

Reagente número 1 - Reagente biureto estoque

Hidróxido de sódio 1860 mmol/L

Tartarato duplo de sódio e potássio 300 mmol/L

Sulfato de cobre 188 mmol/L

Iodeto de potássio 300 mmol/L

Reagente número 2 – Padrão

Solução aquosa de albumina bovina 4,0 g/dL

Azida sódica 8,5 mmol/l

Solução de trabalho

Transferir o conteúdo do frasco número 1 para um balão contendo 450 ml de água → diluindo 1:10 .

Utilização de amostras e solução de trabalho

2,5 mL da solução de trabalho

50 µL da amostra

Reação de ponto final com fator

1.2.3. Técnica do biureto da In vitro-Human®

Reagente número 1 - Reagente biureto estoque

Hidróxido de sódio 40 g/L

Tartarato duplo de sódio e potássio 45 g/L

Sulfato de cobre 15 g/L

Iodeto de potássio 5 g/L

Reagente número 2 – Padrão

Solução aquosa de albumina bovina 4,0 g/dL

Azida sódica 8,5 mmol/l

Solução de trabalho

Transferir o conteúdo do frasco número para um balão contendo 450 ml de água → diluindo 1:10 .

Utilização de amostras e solução de trabalho

1,0 mL da solução de trabalho

20 µL da amostra

Reação de ponto final com fator

1.3. Albumina

1.3.1. Técnica do verde de bromocresol da Bioclin®

Reagente número 1 - Padrão

Albumina 3,8 g/dL

Azida sódica 15,38 mmol/L

Reagente número 2 – Reagente de trabalho estoque

Verde de bromocresol 1 mmol/L

Solução tampão citrato 200 mmol/L pH 3,6

Solução de trabalho

50 mL do reagente número 2 completando o volume de um balão para 500 mL com água destilada → diluição 1: 10.

Utilização de amostra e solução de trabalho

2,5 mL solução de trabalho

10 µL ml de amostra

1.3.2. Técnica do verde de bromocresol da Katal®

Reagente número 1 – Reagente de cor estoque

Verde de bromocresol 1,7 mmol/L

Solução tampão pH 3,6 10 x concentrada

Azida sódica 8,5 mmol/L

Reagente número 2 - Padrão

Albumina 3,8 g/dL

Azida sódica 8,5 mmol/L

Solução de trabalho

50 mL do reagente completando o volume de um balão para 500 mL com água destilada → diluição 1: 10.

Utilização de amostra e solução de trabalho

2,5 mL solução de trabalho

10 µL de amostra

1.3.3. Técnica do verde de bromocresol da In vitro-Human®

Reagente número 1 - Padrão

Albumina 3,8 g/dL

Azida sódica 0,05 g/L

Reagente número 2 – Reagente de trabalho estoque

Verde de bromocresol 0,6 g/L

Ácido cítrico 154 g/dL

Merthiolate 0,4 g/L

Solução de Brij 35 (8,82 mmol/L)

Azida sódica 0,5 g/dL

Solução de trabalho

50 mL do reagente completando o volume de um balão para 500 mL com água destilada → diluição 1: 10.

Utilização de amostra e solução de trabalho

1,5 mL solução de trabalho

5 μ L de amostra

1.4. Creatinina

1.4.1 Técnica cinética colorimétrica de creatinina da Bioclin[®]

Reagente número 1 – Ácido pícrico

Ácido pícrico 60 mmol/L

Reagente número 2 – Tampão

Hidróxido de sódio 110 mmol/L

Carbonato de sódio 75 mmol/L

Reagente número 3 – Padrão

Creatinina 3,0 mg/dL

Preparação do Reagente de trabalho

Misturar uma parte do reagente 1 com o reagente 2

Utilização do reagente de trabalho e amostra

100 μ L de amostra

1,0 mL do reagente de trabalho

Cálculo com fator baseado na absorbância do padrão.

1.4.2. Técnica cinética colorimétrica de creatinina da katal[®]

Reagente número 1 – Tampão

Hidróxido de sódio 125 mmol/L

Tetraborato de sódio 24 mmol/L

Reagente número 2 – Ácido pícrico

Ácido pícrico 44 mmol/L

Reagente número 3 – acidificante

Solução de ácido acético 11 mol/L

Reagente número 4 – Padrão

Creatinina 3,0 mg/dL

Preparação do Reagente de trabalho

Adicionar 2,0 mL do tampão

Adicionar 0,25 ml de água
Adicionar 0,50 mL de ácido pícrico
Adicionar 0,10 ml do acidificante
Utilização do reagente de trabalho e amostra
250µL de amostra
2,85mL do reagente de trabalho
Cálculo baseado na diferença de absorbâncias de duas medidas.

1.4.3. Técnica cinética colorimétrica de creatinina da In Vitro-Human®

Reagente número 1 – Ácido pícrico
Ácido pícrico 48 mmol/L
Reagente número 2 – alcalino
Hidróxido de sódio 112,5 mmol/L
Carbonato de sódio 75,5 mmol/L
Lauril sulfato de sódio 69 mmol/L
Reagente número 3 – Padrão
Creatinina 3,0 mg/dL
Reagente número 4 – acidificante
Solução de ácido acético 8,7 mol/L
Preparação do Reagente de trabalho
Adicionar 2,0 mL do tampão
Adicionar 0,25 ml de água
Adicionar 0,50 mL de ácido pícrico
Adicionar 0,10 ml do acidificante
Utilização do reagente de trabalho e amostra
250 µL de amostra
2,85 mL do reagente de trabalho
Cálculo baseado na diferença de absorbâncias de duas medidas.

1.5. Uréia

1.5.1. Técnica cinética uv da Bioclin®

Reagente número 1 – Padrão

uréia 70 mg/dl (11,67 mmol/L)

Reagente número 2 – Enzimas

Tampão fosfato 100 mmol/L

Urease > 10000 UI

Reagente número 3 – tampão estoque

Tampão fosfato 100 mmol/L pH 7,5

Nitroprussiato de sódio 5 mmol/L

Salicilato de sódio 300 mmol/L

Reagente número 4 – Oxidante estoque

Hidróxido de sódio 1,5 mol/L

Hipoclorito de sódio 10 mmol/L

Preparação do Reagente de trabalho

Preparo da solução coenzima

Adicionar 1,8 ml de H₂O

Preparo do reagente de trabalho

1 parte do reagente 2 em 20 partes do tampão trabalho

Preparo do oxidante de trabalho

450 mL de água destilada diluir o reagente no. 4

Utilização do reagente de trabalho e amostra

Amostra → 10 µL

Reagente trabalho 1,0 mL

Cálculo baseado na diferença de absorbâncias de duas medidas.

Absorbância de 600 nm

1.5.2. Técnica cinética uv da Katal®

Reagente número 1 – tampão

α- cetogluturato 10 mmol/L

azida sódica 15,5 mmol/L.

Reagente número 2 – Enzimas

Urease ≥ 500 KU/l,

Desidrogenase Glutâmica ≥ 150 KU/L

azida sódica 23 mmol/L.

Reagente número 3 – Padrão

Uréia 70 mg/dl (11,67 mmol/L)

Ácido benzóico 20 mmol/L

Preparação do Reagente de trabalho

Preparo da solução coenzima

Adicionar 1,8 ml de H₂O

Preparo do reagente de trabalho

Adicionar 0,5 mL do frasco de enzimas

Adicionar 0,5 mL do frasco de coenzima

Adicionar 01 frasco do tampão 1

Utilização do reagente de trabalho e amostra

10 μ L de amostra

1,0 mL do reagente de trabalho

Cálculo baseado na diferença de absorbâncias de duas medidas.

ΔA do teste / ΔA do padrão x 70

1.5.3. Técnica cinética uv da In Vitro[®]

Reagente número 1 – Enzimas

Tampão Tris (pH 7,8) 120 mmol/L

ADP 750 mmol/L

Urease ≥ 40 KU/L

GLDH $> 4,0$ KU/L

Azida sódica 0,95 g/L

Reagente número 2 – substrato

2- oxoglutarato 25 mmol/L

NADH 112 mmol/L

Azida sódica 0,95 g/L

Reagente número 3 – Padrão

Padrão Ureia – 40 mg/dL

Preparação do Reagente de trabalho

4 partes do reagente 1 – enzimas

1 parte reagente 2 – substrato

Utilização do reagente de trabalho e amostra

1,0 mL do reagente de trabalho

10 µL de amostra

1.6. Glicose

1.6.1. Técnica enzimática colorimétrica de glicose da Bioclin®

Reagente número 1 – Padrão

Glicose 100 mg/dL (5,56 mmol/L)

Ácido benzóico 20,47 mmol/L

Reagente número 2 – Tampão

Tampão fosfato (pH 7,0) 100 mmol/L

Fenol 10 mmol/L

Reagente número 3 – enzimático líquido estável

Tampão 100 mmol/L (pH 7)

4 – aminoantipirina 0,3 mmol/L

Azida sódica 15,38 mmol/L

Glicose oxidase > 10000 U/L

Peroxidase > 700 U/L

Preparação do reagente de trabalho

24 partes do reagente número 2 em

01 parte do reagente número 3

Utilização do reagente de trabalho e amostra

Leitura a 500 nm

1,0 mL do reagente de trabalho

10 µL de amostra

Cálculo com fator

1.6.2. Técnica enzimática colorimétrica de glicose da Katal®

Reagente número 1 – Enzimático

Solução aquosa tampãp pH 7,40

4 – aminoantipirina 0,8 mmol/L

Fenol 11 mmol/L

Glicose oxidase > 15 000 U/L

Peroxidase > 1000 U/L
p-hidroxibenzoato de metila 6,5 mmol/L
Reagente número 2 – padrão
Glicose 100 mg/dL 5,56 mmol/L)
Ácido benzóico 0,25%
Reagente de trabalho é o reagente enzimático (1)
Utilização do reagente de trabalho e amostra
1,0 mL reagente de trabalho
10 µL de amostra
Ler a absorbância de 505 nm
Cálculo por fator

1.6.3. Técnica enzimática colorimétrica de glicose da In Vitro-Human®

Reagente número 1 – enzimático
Tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 7,5)
4- aminofenazina 0,25 mmol/L
Fenol 0,75 mmol/L
Glicose oxidase > 15 000 U/L
Peroxidase > 1500 U/L
Reagente número 2 – Padrão
Glicose 100 mg/dL (5,56 mmol/L)
Reagente de trabalho pronto para uso
Utilização do reagente de trabalho e amostra
2,0 mL do reagente número 1
20 µL de amostra
Ler absorbância de 500 nm
Cálculo com fator

1.7. Bilirrubina total

1.8.1. Técnica colorimétrica de ponto final de bilirrubina da Bioclin®

Reagente número 1 – Nitrito de sódio
Nitrito de sódio
Reagente número 2 – Sulfanílico

Ácido sulfanílico

Reagente número 3 - acelerador

Preparação do reagente de trabalho

1.7.2. Técnica colorimétrica de ponto final de bilirrubina da Katal®

Reagente número 1 – acelerador

Solução de cafeína 130 mmol/L

Benzoato de sódio 260 mmol/L

Acetato de sódio 460 mmol/L

Reagente número 2 – Ácido sulfanílico

Ácido sulfanílico 5,75 mmol/L

Ácido clorídrico 180 mmol/L

Reagente número 3 – Nitrito de sódio

Solução de nitrito de sódio 72,4 mmol/L

Reagente número 4 - Padrão

Bilirrubina dessecada (liofilizada) 0,3 mg

Reagente número 5 – Solvente

Dimetil sulfóxido anidro

Preparação do reagente de trabalho

Diazo reagente

50 µL de nitrito de sódio

1,5 mL de ácido sulfanílico

Utilização do reagente de trabalho e amostra

Acelerador 1,8 mL

Reagente diazo 0,15 mL

Amostra 50 µL

Ler absorbância de 525 nm

Cálculo com fator

1.7.3. Técnica colorimétrica de ponto final de bilirrubina da In vitro®

Reagente número 1 – Acelerador

Cafeína 34,1 g/dL

Benzoato de sódio 51,8 g/L

Acetato de sódio 51,8 g/L

Solução de Brij 35 1,36 mmol/L
Reagente número 2 – ácido sulfanílico
 Ácido sulfanílico 1 g/L
 Ácido clorídrico 0,2N
Reagente número 3 – Nitrito
 Nitrito de sódio 5 g/L
 Azida sódica 0,20 mmol/L
Reagente número 4 – Padrão estoque
 Bilirrubina 10 mmg/dL
Reagente número 5 – Diluente
 Dimetilsulfóxido 99,5%
Preparação reagente de trabalho
 Diazo reagente
 1,5 mL reagente sulfanílico
 1 gota de reagente nitrito
Utilização do reagente de trabalho e amostra
 4,5 mL do reagente acelerador
 0,5 mL reagente diazo
 300 µL amostra
 Ler absorbância de 530 nm
Cálculo utilizando Fator

1.8. Creatina fosfocinase

1.8.1. Técnica cinética de CK da bioclin®

Reagente número 1 – Enzima substrato
 Glicose – 6- fosfato desidrogenase 2000 U/L
 Creatina fosfato 30 mmol/L
 ADP 2 mmol/L
 AMP 5 mmol/L
 Diadenosina pentafosfato 10 mmol/L
Reagente número 2 – tampão
 Acetato de imidazol 100 mmol/L (pH 6,7)
 Glicose 20 mmol/L

EDTA 2 mmol/L
NADP 2 mmol/L
Hexoquinase 3500 U/L
Acetato de Magnésio 10 mmol/L
N-acetilcisteína 20 mmol/L

Preparação do reagente de trabalho

4 partes do reagente número 2
1 parte do reagente número 1

Utilização do reagente de trabalho e amostra

1,0 ml do reagente de trabalho
20 µL de amostra

Calcular o delta absorbância mediar tempo 0, 1, 2, e 3 minutos

Multiplicar delta absorbância x fator (8095)

Linearidade até 2000 U/L

1.8.2. Técnica cinética de CK da Labtest®

Reagente número 1 -

Imidazol 125 mmol/L
Glicose 25 mmol/L
Acetato de Magnésio 15 mmol/L
N-acetil cisteína 25 mmol/L
NAD 2,5 mmol/L
Hexoquinase (HK) > 3500 U/L
Azida sódica 15 mmol/L

Reagente número 2

ADP 13 mmol/L
AMP 25 mmol/L
Diadenosina Pentafosfato > 60 µmol/L
Glicose – 6 – Fosfato desidrogenase > 10000 U/L
Creatina Fosfato 150 mmol/L
Azida sódica 15 mmol/L

Preparação do reagente de trabalho

4 parte do reagente 1
1 parte do reagente 2

Utilização do reagente de trabalho e amostra

1,0 mL do reagente de trabalho

20 µL da amostra

Calcular o delta absorvância / minuto

Medir A 0, 1, 2, e 3 minutos

Delta A /min X fator (8095)

1.8.3. Técnica cinética de CK da katal®

Reagente número 1 – Enzima

Glicose – 6 – P desidrogenase 2000 U/L

Creatina fosfato 30 mmol/L

ADP 2 mmol/L

AMP 5 mmol/L

Diadenosina Penta fosfato 10 mmol/L

Reagente número 2 – Tampão

Acetato de imidazol 100 mmol/L

Glicose 20 mmol/L

EDTA 2 mmol/L

NADP 2 mmol/L

Hexoquinase 3500 U/L

Acetato de magnésio 10 mmol/L

N-acetilcisteína 20 mmol/L

Preparação do reagente de trabalho

01 parte do reagente 1

04 partes do reagente 2

Utilização do reagente de trabalho e amostra

1,0 mL do reagente de trabalho

50 µL da amostra

Calcular o delta absorvância / minuto

Delta absorvância em 0,1,2, 3 minutos.

Delta absorvância x fator 3376

1.9. Fosfatase alcalina

1.9.1. Técnica cinética IFCC de fosfatase alcalina Bioclin®

Reagente número 1 – Tampão

Tampão dietanolamina 1,0 mol/L pH 9

Azida sódica 15 mmol/L

Reagente número 2 – Substrato

p-Nitrofenilfosfato 10 mmol/L

Azida sódica 15 mmol/L

Preparação do reagente de trabalho

9 partes do reagente 1

1 parte do reagente 2

Calcular o delta absorbância / minuto

Delta absorbância em 0,1,2, 3 minutos.

Delta absorbância x fator 2757

1.9.2. Técnica cinética DGKC de fosfatase alcalina da katal®

Reagente número 1 – Tampão

Solução tamponada pH 9,80

Cloreto de magnésio 0,5 mmol/L

Azida sódica 15,5 mmol/L

Reagente número 2 – substrato

Solução aquosa 10x concentrada

p-nitrofenilfosfato de sódio 100 mmol/L

Azida sódica 15,5 mmol/L

Preparo do reagente de trabalho

9 partes do reagente número 1

1 parte do reagente número 2

Calcular o delta absorbância / minuto

Delta absorbância em 0,1,2, 3 minutos.

Delta absorbância x fator 2700

Opção de uso de fatores para cada temperatura

25° - 30° - 37°

1.9.3. Técnica cinética IFCC de fosfatase alcalina da In vitro®

Reagente número 1 – Substrato

Dioxano 80%

Timolftaleína monofosfato de magnésio 16,9 g/L

Reagente número 2 – Tampão

Dietanolamina 2,9 %

Brij 35 2,1 g/L pH 10,15

Reagente número 3 – reagente de cor

Hidróxido de sódio 4 g/L

Carbonato de sódio 16 g/L

Reagente número 4 – Padrão

Timolftaleína 40 UI

Preparação do reagente de trabalho e utilização da amostra

Reagente número 1 – substrato 50 µL

Reagente número 2 – tampão 0,5 mL

Reagente de cor 2,0 mL

Amostra 50 µL

Cálculo do fator

1.10. Gamma-glutamiltransferase

1.10.1. Técnica da Bioclin – cinética – Szasz modificado®

Reagente número 1 – Tampão

Tampão Tris 133 mmol/L

Glicilglicina 138 mmol/L

Azida sódica 15,38 mmol/L

Reagente número 2 – Substrato

Glutamil – nitroanilida (GMA GPNA) 23 mmol/L

Azida sódica 15,38 mmol/L

Preparo do reagente de trabalho

4 mL do reagente 1

1 mL do reagente 2

Utilização do reagente de trabalho e amostra

50 µL da amostra

1,0 mL do reagente de trabalho
Calcular o delta absorbância/ minuto
Aos 0, 1, 2, 3 minutos
Delta absorbância x fator x 2121 – 405 nm

1.10.2. Técnica cinética de γ -glutamyltransferase da Katal[®]

Reagente número 1 – Tampão

Glicil glicina 150 mmol/L

Azida sódica 15,5 mmol/L

Reagente número 2 – substrato

L- γ -glutamyl-p-nitroanilida 6,0 mmol/L

Azida sódica 15,5 mmol/L

Preparação do reagente de trabalho

Adicionar o conteúdo do frasco número 2 ao conteúdo do frasco número 1.

Utilização do reagente de trabalho e amostra

1,0 mL do reagente de trabalho

50 μ L de amostra

Calcular o delta absorbância/ minuto

Aos 0, 1, 2, 3 minutos

Delta absorbância x fator x 2121 – 405 nm

1.10.3. Técnica cinética de γ -glutamyltransferase da In Vitro[®]

Reagente número 1 – Tampão

Tris (pH 8,25) 100 mmol/L

Glicilglicina 150 mmol/L

Azida sódica 0,095%

Reagente número 2 – Substrato

L-gamma glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida 20 mmol/L

Azida sódica 0,095%

Preparação do reagente de trabalho

2,0 mL do substrato

8,0 mL do tampão

Utilização do reagente de trabalho e amostra

100 µL de amostra
1,0 mL do reagente de trabalho
Calcular o delta absorbância/ minuto
Aos 0, 1, 2, 3 minutos
Delta absorbância x fator x 1158 – 405 nm

1.11. Aspartato aminotransferase

1.11.1. Técnica cinética de aspartato aminotransferase da Bioclin®

Reagente número 1 – Substrato

LDH 800 mmol/L

MDH 600 U/L

L-aspartato 200 mmol/L

Tampão tris 80 mmol/L pH 7,8

Azida sódica 15,38 mmol/L

Reagente número 2 – Coenzima

NADH 0,18 mmol/L

Alfa cetoglutarato 12 mmol/L

Preparação do reagente de trabalho

9 partes do reagente 1

1 parte do reagente 2

Utilização do reagente de trabalho e amostra

1,0 mL do reagente de trabalho

100 µL de amostra

Calcular o delta absorbância/ minuto

Aos 0, 1, 2, 3 minutos

Delta absorbância x fator x 1746 – 340 nm

1.11.2. Técnica cinética de aspartato aminotransferase da Katal®

Reagente número 1 – Tampão

α-ceto glutarato 12 mmol/L

L-aspartato 240 mmol/L

EDTA 5 mmol/L

Azida sódica 15,5 mmol/L

Reagente número 2 – Enzimático

MDH – Desidrogenase málica > 42000 U/L

LDH – Desidrogenase lática > 60000 U/L

Azida sódica 15,5 mmol/L

Reagente número 3 – Coenzima

NADH₂ liofilizado concnetração de 25 mmol/L

Preparação do reagente de trabalho

Reconstituir o frasco de coenzima

Colocar 0,25 mL de coenzima em um frasco de tampão

Colocar 0,25 mL de reagente enzimático no mesmo frasco

Utilização do reagente de trabalho e amostra

Colocar 1,0 mL do reagente de trabalho

Adicionar 100 µL de amostra

Calcular o delta absorbância/ minuto

Aos 0, 1, 2, 3 minutos

Delta absorbância x fator x 1745 – 340 nm

1.11.3. Técnica cinética de aspartato aminotransferase da In vitro®

Reagente número 1 – BUF tampão

Tris (pH 7,8) 100 mmol/L

L-aspartato 300 mmol/L

LDH > 0,9 KU/L

MDH > 0,6 KU/L

Azida sódica 0,095%

Reagente número 2 – Substrato

2-oxoglutarato 60 mmol/L

NADH 0,9 mmol/L

Azida sódica 0,095%

Preparação do reagente de trabalho

2 mL do reagente número 2

8 mL do reagente número 1

Utilização do reagente de trabalho e amostra

1,0 mL reagente de trabalho

100 µL de amostra

Calcular o delta absorvância/ minuto

Aos 0, 1, 2, 3 minutos

Delta absorvância x fator x 1745 – 340 nm

1.12. Cálcio

1.12.1. Metodologia arsenazo III da Bioclin®

Reagente número 1 – Padrão

Cálcio 10 mg/dL

Azida sódica 0,1%

Reagente número 2 – arsenazo III –

Tampão 100 mmol/L pH 6,8

Arsenazo III 0,2 mmol/L

L-8- hidroxiquinoleína 5 mmol/L

Azida sódica 0,1 %

Preparação do reagente de trabalho

1,0 mL do reagente número 2

Utilização de reagente de trabalho e amostra

1,0 mL do reagente de trabalho

10 µL de amostra

Cálculo com Fator – padrão

1.12.2. Técnica cresolftaleína complexona de cálcio da In vitro®

Reagente número 1 – Tampão

2-amino – 2- metil – 1- propanol 0,5 M

Cianeto de potássio 0,5 g/L

Brij 35 (0,45 g/L)

Reagente número 2 – de Cor

Cresolftaleína 70 mg/dL

Ácido clorídrico 96 mmol/L

Hidroxiquinoleína 2 g/L

Reagente número 3 – padrão

Carbonato de cálcio 0,25 g/L

Azida sódica 0,325 g/L

Preparação do reagente de trabalho

Reagente número 1 0,5 mL

Reagente número 2 0,5 mL

Utilização do reagente de trabalho e amostra

1,0 mL do reagente de trabalho

10 μ L de amostra

Cálculo com fator em 570 nm

1.12.3. Técnica cálcio arsenaso III da Labtest[®]

Reagente número 1 – Padrão

Cálcio 10 mg/dL

Azida sódica 0,1 %

Reagente número 2 – Arsenaso III

Tampão 100 mmol/L , pH 6,8

Arsenaso 110,2 mmol/L

L- Hidroxiquinoleina 5 mmol/L

Azida sódica 0,1%

Reagente pronto para uso

Utilização do reagente de trabalho e amostra

1,0 mL do reagente arsenaso

10 μ L de amostra

Cálculo com utilização de fator

1.13. Cloretos

1.13.1. Técnica colorimétrica de cloretos da Bioclin[®]

Reagente número 1 – Padrão

Cloretos 100 mEq/L

Reagente número 2 – Reagente de cor

Tiocianato de mercúrio 2 mmol/L

Nitrato férrico 17 mmol/L

Reagente número 3 – ativador

Ácido perclórico 1,5 mmol/L

Preparação do reagente de trabalho

Reagente número 2 → 3,5 mL

Reagente número 3 → 100 µL

Utilização do reagente de trabalho e amostra

Reagente de trabalho 3,6 mL

Amostra 10 µL

Cálculos com fator

1.13.2. Técnica titulométrica modificada de cloretos da In vitro®

Reagente número 1 – Indicador

Difenilcarbazona

Reagente número 2 – Padrão

Pó dessecado cloretos – 100 mEq/L

Reagente número 3 – Nitrato

Nitrato de mercúrio 3 g/L

Ácido nítrico 2 N 2%

Preparação do reagente de trabalho

10 mL de metanol

Proceder a titulação

Água 1,0 mL

Reagente 1 – indicador – 1 gota

Cálculo

Cloretos = $100 \times V \times 2$

1.13.3. Técnica colorimétrica de cloretos da Labtest®

Reagente número 1 – Reagente de cor

Tiocianato de mercúrio 2 mmol/L

Nitrato férrico 17 mmol/L

Ácido nítrico 30 mmol/L

Reagente número 2 – ativador

Nitrato de mercúrio 1,1 mmol/L

Ácido nítrico 0,9 mmol/L

Reagente número 3 – Padrão

Cloretos – 100 mEq/L

Preparação reagente de trabalho

Reagente de cor 3,5 ml
Ativador 0,1 mL
Utilização do reagente de trabalho e amostra
3,6 mL do reagente de trabalho
10 µL de amostra
Cálculo com fator à 450 – 510 nm

1.14. Magnésio

1.15.1. Método de Mann e Yoe de magnésio da Bioclin®

Reagente número 1 – Tampão
Tetraborato de sódio 30 mmol/L
Reagente número 2 – Reagente de cor
Magon sulfonado 2,8 mmol/L
Reagente número 3 – Padrão
Padrão Magnésio 2 mg/dL
Preparação do reagente de trabalho
Reagente número 1 – 1,0 mL
Reagente número 2 – 1,0 mL
Utilização do reagente de trabalho e amostra
2,0 ml do reagente de trabalho
20 µL de amostra
Cálculo com fator absorbância a 500 nm

1.14.2. Método automação de magnésio da In vitro®

Reagente número 1 –
Tris (Hidroximetil) aminometano 24,2 g/L
Carbonato de potássio 10,5 g/L
Azida sódica 0,25 g/L
Azul de xilidila 0,05 g/L
Reagente número 2 – Padrão
Magnésio ionizado 2,0 mg/dL
Azida sódica 1,0 g/L
Reagente de trabalho pronto para uso

Utilização de reagente de trabalho e amostra

100 partes de reagente

1 parte de amostra

Cálculo através de fator absorvância 520 nm

1.14.3. Método magon sulfonado de magnésio da labtest®

Reagente número 1 – Tampão

Carbonato de potássio 153 mmol/L

Azida sódica 15,4 mmol/L

Reagente número 2 – Magon sulfonado

Magon sulfonado 0,1 g/L

Reagente número 3 – Padrão

Magnésio 2,0 mg/dL

Preparação do reagente de trabalho

1 parte de reagente número 1

1 parte de reagente número 2

Utilização do reagente de trabalho e amostra

2,0 mL do reagente de trabalho

20 µL de amostra

Cálculo contra fator em absorvância de 500 nm