

ROGERIO BATISTA DOS SANTOS

Estudo sobre métodos de avaliação da anemia ferropriva em bezerros
neonatos

São Paulo

2013

ROGERIO BATISTA DOS SANTOS

Estudo sobre métodos de avaliação da anemia ferropriva em bezerros neonatos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Fernando José Benesi

De acordo: _____
Orientador(a)

São Paulo

2013

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2911
FMVZ

Santos, Rogério Batista dos
Estudo sobre métodos de avaliação da anemia ferropriva em bezerros neonatos /
Rogério Batista dos Santos. -- 2013.
87 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Fernando José Benesi.

1. Zinco protoporfirina. 2. Anemia ferropriva. 3. Bezerros neonatos. 4. Hematologia veterinária. 5. Ferro sérico. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Estudo sobre métodos de avaliação de anemia ferropriva em bezerros neonatos”, protocolado sob o nº 2520/2012, utilizando 120 (cento e vinte) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Fernando José Benesi, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/2/2012.

We certify that the Research “Study of evaluating methods for iron deficiency anemia in newborn calves”, protocol number 2520/2012, utilizing 120 (one hundred and twenty), under the responsibility Prof. Dr. Fernando José Benesi, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 2/15/2012.

São Paulo, 16 de fevereiro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SANTOS, Rogerio Batista dos

Título: Estudo sobre métodos de avaliação da anemia ferropriva em bezerros neonatos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico esta obra e os resultados dela consequentes a Deus, minha fonte de vida e energia, verdadeira razão da minha existência, melhor amigo e responsável por toda a minha gratidão.

De modo semelhante, também a dedico à minha linda e amada esposa, Vanessa Santos, responsável pela minha alegria e motivação, companheira fiel e compreensiva, proprietária absoluta do meu amor.

Aos meus pais, Gildo e Ildaci, pelo amor depositado, investimento em educação e por acreditarem que eu poderia ir além das expectativas, a eles também dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e "pai na ciência", Prof. Dr. Fernando José Benesi, por sua orientação, por todos ensinamentos, pela confiança depositada ao longo destes 13 anos e também pela paciência na condução da equipe. Meus sinceros agradecimentos.

Aos professores da clínica de ruminantes, Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, Prof. Dr. Wanderley Pereira de Araújo (*in memoriam*), Prof.^a Dr.^a Alice Maria M. P. Della Libera, Prof.^a Dr.^a Lilian Gregory, Prof.^a Dr.^a Viviani Gomes e Prof.^a Dr.^a Maria Claudia Araripe Sucupira, pelo apoio e ensinamentos recebidos, e demais docentes do Departamento de Clínica Médica, pelos exemplos de profissionalismo, idealismo e dedicação. Em especial a Prof.^a Dr.^a Lilian Emy dos Santos Michima e ao Prof. Dr. José Grisi Filho, pelo auxílio na aprendizagem estatística, e ao Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Júnior, pela amizade e incentivo na docência.

Em especial ao Prof. Dr. Fabio Celidonio Pogliani, pela amizade sincera e desinteressada, pelas trilhas e montanhas percorridas (a Patagônia que o diga), pelas risadas e sonhos compartilhados, por ser um verdadeiro irmão.

Às amigas Caroline Harumi Seino (Tartaruga da Primavera), Carolina de Lara Shecaira (Loira), Juliana Aparecida Bombardelli (Jú) e Gabriela Alves Reis (Gabi), e demais "benesetes", Clara Lupatinni e Heitor Amaral, pela inestimável ajuda, amizade e coleguismo. Sem vocês seria bem mais difícil e, além do mais, tanto o trabalho de campo como o laboratorial não teriam a menor graça. Muito obrigado.

Aos amigos e colegas de pós-graduação, residentes e demais "frequentadores" da Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes: Milton Azedo, Sandro Colla, Eduardo Marques, Enoch Meira Junior, Marjorie Hasegawa, Fred Mazzocca, Leonardo Barreira, Carolina Araújo, Melina Yasuoka, Camila Batista, Heloisa Bertagnon, Renata Gomes, Camila Costa, Cynthia Costa, Sylvia Novo, Vinicius Baldacim, Aline Morgado, Kamila Reis, Fábio Sellera, Ronaldo Gargano, Loraine Fernandes, Bruno Leonardo, Rodrigo Malzoni, Marcela Faria e Camila Martin. A todos vocês que de alguma forma ou outra certamente me ajudaram, muito obrigado pelos momentos de convivência, alegria, aprendizado e amizade.

Aos funcionários do Setor de Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes do Hospital Veterinário da FMVZ-USP, especialmente ao Sr. Edson, pela gentileza sempre presente.

Ao pessoal do laboratório de hematologia e de bioquímica (Samantha, Maria Helena, Maú e Clara), pela paciência e cooperação sempre presentes durante o processamento das amostras.

À dona Carmem, pela dedicação habitual com que cuida dos materiais utilizados no laboratório.

Ao pessoal das secretarias: Daura, Adelaide, Cida, Carol e Silvana, pela alegre convivência e carinho.

Aos funcionários da biblioteca pela revisão e correção bibliográfica e, em especial à Elena, pela “eterna” paciência e bom humor.

À minha irmã, Cláudia Batista dos Santos e meus sobrinhos, Nelson Junior, Marcell e Vitória, pela compreensão e amor, mesmo à distância.

À Borracharia 64, fonte de verdadeiros e inconvenientes amigos, especialmente em festas de casamento.

Aos meus sogros e segundos pais, Carlos e Sônia, que tanto me incentivaram e apoiaram, mesmo nos momentos mais difíceis.

A todos os amigos e pessoas que ajudaram na minha formação pessoal, espiritual e profissional, contribuindo de alguma forma para a elaboração deste trabalho, especialmente aos meus "filhos espirituais" da Igreja Apostólica Casa Firme na Aldeia da Serra. Sou o pastor mais orgulhoso deste mundo por tê-los por perto, amo vocês de paixão!

À todas as propriedades leiteiras visitadas nos municípios de Bragança Paulista, Jacareí, São José dos Campos, Paraibuna, Pirassununga, Descalvado e, em especial, à Fazenda Colorado em Araras, representada na figura dos Médicos Veterinários Sérgio Soriano e Natália Sobreira, minha sincera gratidão.

Aos bezerros utilizados no experimento, pelo convívio de horas e horas, pelos risos, pelos mugidos, e pelo trabalho concluído.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela bolsa de doutorado concedida, assim como sua respectiva reserva técnica (processo 2010/51363-8), fundamentais para a realização deste trabalho.

"Não se amoldem ao padrão deste mundo, mas transformem-se pela renovação da sua mente, para que sejam capazes de experimentar e comprovar a boa, agradável e perfeita vontade de Deus."

Romanos, 12:2 (NVI)

RESUMO

SANTOS, R. B. **Estudo sobre métodos de avaliação da anemia ferropriva em bezerros neonatos.** [Study of evaluation methods of iron deficiency anemia in newborn calves]. 2013. 87 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A zinco protoporfirina (ZPP) eritrocitária é um metabólito formado pela adição do zinco no sítio do ferro durante a formação da molécula de hemoglobina, quando este último está total ou parcialmente indisponível. O objetivo deste trabalho foi realizar a padronização dos valores da ZPP eritrocitária em bezerros saudáveis com até um mês de vida, assim como a validade da ZPP como previsora da ocorrência de anemia ferropriva em bezerros neonatos, em comparação com outros métodos. Para tanto foram utilizados 134 bezerros da raça Holandesa, com idades variando do nascimento até 30 dias de vida, provenientes de fazendas produtoras de leite localizadas no Estado de São Paulo, classificados como saudáveis (67 animais) e anêmicos (67 animais). Os animais foram monitorados por meio de exames físicos e complementares (hemograma e reticulocitometria, teores de ferro sérico (FT) e capacidade total de ligação do ferro (CTLF), teores de bilirrubinas e de uréia séricas, e concentrações da ZPP). Durante a padronização do exame, os valores médios encontrados foram: concentração de ZPP eritrocitária das amostras de hemácias não lavadas em até 3 horas após a colheita de sangue de 30 animais saudáveis - 80,90 μmol ZPP/mol heme; concentração de ZPP eritrocitária, após a lavagem de hemácias, determinadas até 3 horas e 12 horas após colheita de sangue do mesmo grupo - 61,40 μmol ZPP/mol heme e 61,03 μmol ZPP/mol heme, respectivamente. Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que as amostras de sangue colhidas para a mensuração da ZPP podem ser armazenadas, sob refrigeração a 4°C, por até 12 horas após a colheita, sem alterações significativas dos seus valores, sendo recomendável a lavagem das hemácias antes da mensuração dos valores da ZPP eritrocitária devido à presença de substâncias interferentes no plasma do animal. Foi encontrada diferença significativa nas concentrações da ZPP e de todos os componentes do eritrograma, assim como nos teores do metabolismo de ferro entre os animais anêmicos e saudáveis. As concentrações de bilirrubinas e ureia séricas apresentaram-se no intervalo fisiológico de variação, não interferindo na mensuração da ZPP nos eritrócitos dos bezerros com ou sem anemia. A

correlação entre os valores encontrados dos teores de ferro sérico e da capacidade total de ligação do ferro com as concentrações de ZPP foram: $r_s = -0,45$, $p < 0,001$ (ZPP x FT) e $r_s = 0,51$, $p < 0,001$ (ZPP x CTLF), respectivamente, demonstrando que quanto menores os teores de ferro, maiores serão as concentrações de ZPP. Portanto, a utilização da ZPP como previsor dos quadros de anemia ferropriva em bezerros neonatos com até um mês de vida se mostrou válida e, considerando que a hematofluorometria é um método rápido e não oneroso, pode ser recomendado como exame complementar de rotina.

Palavras-chave: Zinco protoporfirina. Anemia ferropriva. Bezerros neonatos. Hematologia veterinária. Ferro sérico.

ABSTRACT

SANTOS, R. B. **Study of evaluation methods of iron deficiency anemia in newborn calves.** [Estudo sobre métodos de avaliação da anemia ferropriva em bezerros neonatos] 2013. 87 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The zinc protoporphyrin (ZPP) is a metabolic originated by zinc addition in the iron site during the synthesis of hemoglobin molecule, when iron is total or partially unavailable. The aim of this study was to standardize the values of zinc protoporphyrin (ZPP) in erythrocyte of healthy calves until one month of life, and to evaluate this determination as a predictor of the occurrence of iron deficiency anemia in newborn calves, compared with other methods. Therefore, 134 Holstein calves were used, aged from birth to 30 days of life, from dairy farms located in the São Paulo State, splitted into two groups, classified as healthies (67 animals), and anemics (67 animals). The animals were monitored by physical examination and laboratory assessments (complete blood cell count and reticulocytes, serum iron (SI) and total iron binding capacity (TIBC), levels of serum bilirubin and urea, and ZPP levels). During the exam standardization, the mean values found were: erythrocyte ZPP of unwashed erythrocytes within 3 hours after blood sampling of 30 healthy animals - 80.9 $\mu\text{mol ZPP/mol heme}$; erythrocyte ZPP after washing of red blood cells, determined by 3 hours and 12 hours after blood collection, from the same group were 61.40 $\mu\text{mol ZPP/mol heme}$ and 61.03 $\mu\text{mol ZPP/mol heme}$, respectively. Based on these results, it was concluded that blood samples taken for measurement of ZPP may be stored under refrigeration at 4 °C for up to 12 hours, without significant changes of the values of erythrocyte ZPP, and it is also advisable to wash the red cells before erythrocyte ZPP values measuring, due to the presence of interfering substances in the animal plasma. A significant difference was found in the ZPP levels and in all erythrogram components, as well as on the levels of iron metabolism between anemic and healthy animals. The bilirubin and serum urea levels remained within physiological variation, does not interfering with the measurement of erythrocyte ZPP of calves with or without anemia. The correlation values between SI and TIBC with ZPP levels were: $r_s = -0.45$, $p < 0.001$ (ZPP x SI) and $r_s = 0.51$, $p < 0.001$ (ZPP x TIBC), respectively, *i.e.* decreasing biochemical levels of iron

metabolism will increase levels of ZPP. Therefore, the use of ZPP as an iron deficiency anemia predictor in newborn calves up to one month of life has proven its validity, and considering hematofluorometry as a quick and inexpensive method, it might be recommended as a routine exam.

Keywords: Zinc protoporphyrin. Iron deficiency anemia. Newborn calves. Veterinary hematology. Serum iron.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1-	Constituição dos grupos de bezerros, segundo os valores do Volume Globular (VG), para avaliação do hemograma e do número de reticulócitos, dosagens dos valores séricos de ferro, de bilirrubinas e de ureia, e determinação da zinco protoporfirina.....	37
Gráfico 1 -	Distribuição dos valores individuais da zinco protoporfirina eritrocitária (ZPP) de bezerros da raça Holandesa Preta e Branca, no primeiro mês de vida, agrupados segundo presença de anemia, criados em fazendas produtoras de leite no Estado de São Paulo - 2013	46
Gráfico 2 -	Distribuição dos valores individuais do número de Hemácias (He) de bezerros da raça Holandesa Preta e Branca, no primeiro mês de vida, agrupados segundo presença de anemia, criados em fazendas produtoras de leite no Estado de São Paulo - 2013	46
Gráfico 3 -	Distribuição dos valores individuais do Volume Globular (VG) de bezerros da raça Holandesa Preta e Branca, no primeiro mês de vida, agrupados segundo presença de anemia, criados em fazendas produtoras de leite no Estado de São Paulo - 2013	47
Gráfico 4 -	Distribuição dos valores individuais das concentrações de Hemoglobina (Hb) de bezerros da raça Holandesa Preta e Branca, no primeiro mês de vida, agrupados segundo presença de anemia, criados em fazendas produtoras de leite no Estado de São Paulo - 2013	47
Gráfico 5 -	Distribuição dos valores individuais dos teores de ferro sérico de bezerros da raça Holandesa Preta e Branca, no primeiro mês de vida, agrupados segundo presença de anemia, criados em fazendas produtoras de leite no Estado de São Paulo - 2013	49
Gráfico 6 -	Distribuição dos valores individuais da Capacidade Total de Ligação do Ferro (CTLF) de bezerros da raça Holandesa Preta e Branca, no primeiro mês de vida, agrupados segundo presença de anemia, criados em fazendas produtoras de leite no Estado de São Paulo - 2013	50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Valores das médias aritméticas individuais obtidas a partir das mensurações em triplicata de cada amostra de sangue, com hemácias lavadas ou não em dois momentos pós colheita (p.c.), para o teor de zinco protoporfirina eritrocitária (ZPP $\mu\text{mol/mol}$ de Heme) de bezerros clinicamente sadios (n=30) do Estado de São Paulo - 2013..... 42
- Tabela 2 - Valores das médias e desvios-padrão, medianas, erro padrão das médias, valores máximo e mínimo da zinco protoporfirina eritrocitária (μmol de ZPP/mol de heme) obtidos de amostras de sangue colhidas com EDTA, lavadas previamente ou não, em dois momentos pós colheita (p.c.) de bezerros clinicamente sadios do Estado de São Paulo - 2013..... 43
- Tabela 3 - Valores médios e desvios padrão obtidos para as concentrações de zinco protoporfirina (ZPP) e os componentes do eritrograma: número de hemácias (He), volume globular (VG), taxa de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), e reticulocitometria em bezerros da raça Holandesa Preta e Branca, no primeiro mês de vida, agrupados segundo o volume globular, criados em fazendas produtoras de leite no Estado de São Paulo - 2013 45
- Tabela 4 - Valores médios e desvios padrão obtidos para os componentes do leucograma de bezerros da raça Holandesa Preta e Branca, no primeiro mês de vida, agrupados segundo o volume globular (VG), criados em fazendas produtoras de leite no Estado de São Paulo - 2013 48
- Tabela 5 - Valores médios e desvios padrão obtidos para as concentrações séricas de bilirrubinas total (BT), direta (BD) e indireta (BI), taxa de ferro total sérico (FT), capacidade total de ligação do ferro (CTLF) e ureia sérica de bezerros da raça Holandesa Preta e Branca, no primeiro mês de vida, agrupados segundo o volume globular (VG), criados em fazendas produtoras de leite no Estado de São Paulo - 2013 49
- Tabela 6 - Resultados de correlação (r_s) e respectivo nível descritivo (“p”) do teste de Pearson entre valores obtidos para as concentrações de zinco protoporfirina (ZPP) contra os valores do número de hemácias (He), do volume globular (VG), da taxa de hemoglobina (Hb), do volume corpuscular médio

(VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM), da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), do número de reticulócitos e de leucócitos, das concentrações de bilirrubinas total (BT), direta (BD) e indireta (BI), da taxa de ferro total sérico (FT), da capacidade total de ligação de ferro (CTLF) e da ureia serica de 134 bezerros da raça Holandesa Preta e Branca, no primeiro mês de vida, criados em fazendas produtoras de leite no Estado de São Paulo - 2013

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BD	bilirrubina direta
BI	bilirrubia indireta
BT	bilirrubina total
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
CTLF	capacidade total de ligação do ferro
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	ensaio imunossorvente ligado à enzima (do inglês: Enzyme Linked Immuno Sorbet Assay)
FMVZ/USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/Universidade de São Paulo
FT	ferro sérico total
HCM	hemoglobina corpuscular média
He	hemácias
HG	taxa hemoglobina
K-S	teste de Kolmogorov-Smirnov
OPG	ovos por grama de fezes
p.c.	pós colheita
PEL	protoporfirina eritrocitária livre
PPE	protoporfirina eritrocitária
RDW	variação da largura das hemácias (do inglês: Red Cell Distribution Width)
VCM	volume corpuscular médio
VG	volume globular
ZPP	zinco protoporfirina

LISTA DE SÍMBOLOS

fL	fentolitros
g	giros
g/L	gramas por litro
g/dL	gramas por decilitro
°C	graus Celsius
=	igual
>	maior
<	menor
μL	microlitros
μmol/L	micromol por litro
μmol/mol	micromol por mol
μmol	micromol
mg/mL	miligramas por mililitro
mL	mililitros
mm	milímetros
mmol/L	milimol por litro
nm	nanômetros
pg	picogramas
%	porcentagem
rpm	rotações por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	ANIMAIS	36
3.2	HEMOGRAMA E RETICULOCITOMETRIA.....	37
3.3	BIOQUÍMICA SÉRICA	38
3.3.1	Metabolismo de ferro	38
3.3.2	Dosagem de bilirrubinas séricas	38
3.3.3	Dosagem da ureia sérica	39
3.4	DETERMINAÇÃO DA ZINCO PROTOPORFIRINA	39
3.5	EXAME COPROPARASITOLÓGICO	40
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4	RESULTADOS	42
4.1	PADRONIZAÇÃO DOS VALORES DA ZINCO PROTOPORFIRINA ERITROCITÁRIA EM BEZERROS CLINICAMENTE SADIOS	42
4.2	AVALIAÇÃO DA ZINCO PROTOPORFIRINA ERITROCITÁRIA COMO PREVISORA DA OCORRÊNCIA DE ANEMIA FERROPRIVA EM BEZERROS COM ATÉ UM MÊS DE VIDA	44
5	DISCUSSÃO	52
5.1	PADRONIZAÇÃO DOS VALORES DA ZINCO PROTOPORFIRINA ERITROCITÁRIA EM BEZERROS CLINICAMENTE SADIOS	52
5.2	AVALIAÇÃO DA ZINCO PROTOPORFIRINA ERITROCITÁRIA COMO PREVISORA DA OCORRÊNCIA DE ANEMIA FERROPRIVA EM BEZERROS COM ATÉ UM MÊS DE VIDA	55
6	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de anemia tem sido registrada no período neonatal de vida de bezerros em vários estudos internacionais (KANEKO; MILLS, 1970; BIRGEL, 1972; TENNANT; HARROLD; REINA-GUERRA, 1975; REECE, 1980; MCGILLIVRAY; SEAROY; HIRSCH, 1985; JAIN, 1986; DRYDEN; BROCE; MOORE, 1993). Muitas dessas observações derivam de pesquisas sobre hematologia de bezerros recém nascidos sadios com o objetivo de caracterizar as variações fisiológicas do quadro hemático nos períodos perinatal e neonatal e que evidenciaram uma frequência significativa de anemia ao nascimento em bezerros provenientes de vacas aparentemente sadias (BIRGEL, 1972; TENNANT; HARROLD; REINA-GUERRA, 1975). Trabalho sobre a ocorrência de anemia em rebanhos de bezerros das raças Jersey e Holandesa nos Estados Unidos, demonstrou que 15,8% dos animais avaliados apresentaram esse problema (TENNANT; HARROLD; REINA-GUERRA, 1975). De modo similar, em estudo preliminar realizado por Benesi et al. (2000), em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo, foi evidenciado que 14,3% (55/385) das bezerras da raça holandesa com até um mês de vida, apresentavam volume globular inferior a 25%.

A anemia é uma condição que pode se desenvolver basicamente a partir de três situações: hemólise, hemorragia, ou quando o processo de eritropoiese for reduzido ou inefetivo. Em todos os casos a anemia é resultado da inabilidade do tecido eritropoiético em repor rapidamente as hemácias, a fim de prevenir a redução do número de células abaixo do limite fisiológico mínimo para a espécie (BENNETT, 1983; BENESI, 1985). Assim, a anemia raramente é resultante de uma doença primária e sim uma consequência observada dentre aquelas determinadas em uma série de processos patológicos (BENESI, 1985). Estudos referentes à etiologia das anemias apontam para duas classificações distintas obtidas por exames laboratoriais, a saber: a baseada na resposta da medula óssea e aquela morfohematimétrica. A primeira delas classifica as anemias em regenerativas (ou responsivas) e não regenerativas (ou não responsivas). As regenerativas apresentam evidências de que há um bom funcionamento da medula óssea, o que indicaria que a anemia pode estar sendo causada por perda sanguínea ou por hemólise, ou seja, tem causas extra-medulares. Nas não regenerativas não há

caracterização de resposta medular primária e tem causa na medula óssea. A segunda classificação, baseada na hematimetria, é feita por meio dos índices hematimétricos absolutos, particularmente do volume corpuscular médio (VCM) e da concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM). Com as alterações ou não do VCM poderemos ter anemias macrocítica (VCM aumentado), normocítica (VCM normal) e microcítica (VCM diminuído). Com as variações ou não do CHCM teremos anemia normocrômica (CHCM normal) e hipocrômica (CHCM diminuído), conforme descrito por diversos autores (BIRGEL, 1982; BENESI, 1985; TVEDTEN; WEISS, 2000).

As manifestações clínicas das anemias são variáveis e dependentes da etiologia e patogênese do processo, do grau ou intensidade da anemia, das alterações do volume total do sangue circulante e das exigências e/ou manejo a que estão sujeitos os animais afetados (BENESI, 1985). Ocorrem sintomas determinados pela hipóxia tecidual, que decorrem dos chamados mecanismos compensatórios, que visam minorá-la ou prevení-la. Convém, no entanto, ressaltar-se que nas perdas agudas ou nas crônicas, pode observar-se respectivamente má adaptação e má compensação, ou até mesmo ausência de compensação. Segundo Benesi (1985), as adaptações compensatórias secundárias caracterizam-se por aumento da frequência respiratória, aumento da frequência de batimentos e do rendimento cardíacos e pelo favorecimento da perfusão sanguínea dos órgãos vitais, além evidentemente das eritropoiéticas, que representam o mecanismo compensatório primário, visando o aumento da produção de eritrócitos, por meio do estímulo hipóxico tecidual que promove a liberação de eritropoietina no rim, e esta à estimulação da eritropoiese na medula óssea.

A etiologia das anemias em neonatos da espécie bovina é a mais variada possível, tendo como causa frequentemente destacada a deficiência de ferro (BIRGEL, 1972, TENNANT; HARROLD; REINA-GUERRA, 1975; REECE, 1980), sugerindo-se que a mesma pode ser desenvolvida no período fetal, em consequência de um impedimento de transferência de ferro da mãe para o feto (TENNANT; HARROLD; REINA-GUERRA, 1975), ou por dieta pobre em ferro pela utilização de substitutos do leite como alimento exclusivo, relatada como causa natural ou experimental de anemia ferropriva (REECE, 1980). Na opinião de Jain (1986), a causa mais comum de anemia por deficiência de ferro é aquela resultante das perdas crônicas de sangue, citando-se entre outras possibilidades as infecções

e infestações intensas causadas por endoparasitas e ectoparasitas, respectivamente, sugadores de sangue ou não. Neste particular assinala-se estudo experimental realizado por Carvalho e Silva (1989), demonstrando que a infecção massiva por *Strongyloides papillosus* pode causar anemia e em outros relatos, a constatação de anemia ferropriva em bezerros neonatos com alta infestação por pulgas (BENESI et al., 1998; DRYDEN; BROCE; MOORE, 1993).

As anemias hemolíticas também têm registro entre os bezerros neonatos, sendo no entanto de ocorrência menos frequente. São citadas como causa destas a porfíria eritropoiética (KANEKO; MILLS, 1970), a anaplasnose congênita (KLOBUCARIC; BENESI; BIRGEL, 1986; BENESI et al., 1999) e anemia por isoeritrolise neonatal, causada por imunoglobulinas anti eritrócitos presentes em colostro de vacas vacinadas contra a anaplasnose (LUTHER; COX; NELSON, 1985).

Após perda de sangue por hemorragia e/ou hemólise intensa, segundo Birgel (2000), há diminuição do volume total de sangue com compensação rápida por aumento do volume plasmático, restaurando a volemia. A medula óssea estimulada pela condição anêmica libera grande quantidade de células jovens e imaturas com maior volume corpuscular médio determinando macrocitose. Após a hiperplasia medular compensatória da anemia para regularizar a oxigenação, a medula retorna à liberação de eritrócitos maduros, ocorrendo então normocitose e normocromia. Nas verminoses, caso o processo de espoliação se prolongue e resulte em perdas intensas e continuadas de sangue, poderá ocorrer a depleção das reservas de ferro e conseqüentemente a anemia torna-se hipocrômica e, finalmente, microcítica. De acordo com esse autor, as anemias microcíticas e hipocrômicas podem ser diferenciadas em duas formas: as ferroprivas e as não ferroprivas. Nas primeiras, além das características hematimétricas peculiares, observa-se uma significativa diminuição das concentrações plasmáticas de ferro, ao passo que nas segundas a sideremia tem seus valores no intervalo das variações fisiológicas. Nessa última forma, os estados de subnutrição determinam déficit protéico que impedirá a formação normal da hemoglobina, por não haver substrato de nutrientes para a síntese da globina, mesmo em presença de quantidades suficientes de ferro.

Diante do exposto, o metabolismo do ferro assume um importante papel nas condições anêmicas, uma vez que a maior quantidade deste elemento no organismo encontra-se localizado na hemoglobina. A molécula de hemoglobina é composta por

duas frações, a não protéica denominada heme, e a proteica, que é a globina (ALBERTS et al., 2006). A sua produção tem início nos normoblastos policromatófilicos e se completa nos reticulócitos. No estágio final da síntese do heme, o ferro é incorporado à protoporfirina IX, um anel tetrapirrólico, para formar a fração heme que se liga à globina formando assim a hemoglobina (ANDREWS; SMITH, 2000; ALBERTS et al., 2006; OLVER et al., 2010).

Esta última ligação do ferro é catalisada pela enzima ferroquelatase que, quando da depleção do ferro ou em sua disponibilização tardia para a eritropoiese, acaba ligando o zinco na protoporfirina IX, formando assim um composto denominado zinco protoporfirina (ZPP), o qual permanece no interior da hemácia. Essa substituição ocorre predominantemente dentro da medula óssea e a proporção ZPP/heme nos eritrócitos reflete o “*status*” de ferro na mesma (LABBÉ; DEWANJI; McLAUGHLIN, 1999). Dessa forma a ZPP tem se mostrado um parâmetro de alta especificidade e sensibilidade para o diagnóstico da anemia (MAFRA, 2001), uma vez que este composto identifica a deficiência de ferro antes do desenvolvimento da condição anêmica da mesma, sendo ele naturalmente fluorescente e mensurável por fluorometria (WONG et al., 1996). A mensuração da ZPP é feita através do uso do hematofluorômetro. Além da ZPP também é medida a hemoglobina presente na amostra de sangue total e o seu resultado é expresso pela razão ZPP: hemoglobina (LAMOLA; EISINGER; BLUMBERG, 1980; MAFRA; COZZOLINO, 2000).

A crescente necessidade de se obter melhores resultados nos diversos segmentos da pecuária nacional representa um grande desafio para as instituições produtoras de conhecimento técnico. Esse desafio, por sua vez, tem sido a razão pela qual grande parcela dos pesquisadores tem se empenhado de forma cada vez mais intensiva para obter as melhores soluções para o crescimento e aprimoramento da produção agropecuária do país. Quando nos referimos a bovinocultura leiteira, de imediato nos defrontamos com aquela que é sem dúvida a principal fase de perda da cadeia produtiva, a saber, a fase neonatal.

A ausência de informações a respeito da etiologia e ocorrência das anemias em condições nacionais de criação, além das observações do quadro de anemia em animais neonatos que chegam ao Serviço de Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes do Hospital Veterinário da FMVZ/USP para atendimento clínico ou durante o desenvolvimento de pesquisas em bezerros no primeiro mês de vida, associada ao desconhecimento dos padrões fisiológicos e da utilização da avaliação

da zinco protoporfirina como ferramenta que permite o diagnóstico da anemia ferropriva em bezerros motivaram a realização deste trabalho, que teve por foco estudar as anemias em bezerros recém nascidos com até um mês de vida, realizando para tal:

- A avaliação e estabelecimento da padronização dos valores da zinco protoporfirina eritrocitária em bezerros sadios com até um mês de vida;
- A avaliação da zinco protoporfirina como previsor da ocorrência de anemia ferropriva em bezerros com até um mês de vida, e em relação a outros métodos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Existem diversas análises que podem ser utilizadas para a avaliação de ferro no organismo em seus diferentes compartimentos, a saber: hematócrito, hemoglobina, ferritina e saturação da transferrina. Entretanto, inexistente teste único que diagnostique adequadamente a deficiência de ferro, uma vez que cada analito avaliado corresponde a uma diferente etapa do metabolismo desse elemento (LABBÉ; DEWANJI; McLAUGHLIN, 1999; LABBÉ; VREMAN; STEVENSON, 1999).

A zinco protoporfirina é um metabólito normalmente encontrado em pequenas quantidades durante o processo da síntese da hemoglobina, sendo esta intensidade de produção elevada na depleção ou indisponibilidade do ferro (LABBÉ; DEWANJI; McLAUGHLIN, 1999; LABBÉ; VREMAN; STEVENSON, 1999). Isto ocorre porque tanto o ferro como o zinco interagem competindo como substrato da enzima ferroquelatase (LABBÉ; RETTMER, 1989), a qual catalisa a ligação do ferro no anel tetrapirrólico, a protoporfirina IX, para a formação do grupo heme e consequente formação da molécula de hemoglobina (ANDREWS; SMITH, 2000; ALBERTS et al., 2006; OLVER et al., 2010). Deste modo, é correto afirmar que o aumento dos valores da zinco protoporfirina podem evidenciar uma diminuição na disponibilidade do ferro no processo de eritropoiese (LABBÉ; FINCH, 1981).

Porém, é importante salientar que os diferentes testes usados para a avaliação dos teores de ferro no organismo não necessariamente apresentam alguma correlação entre si. Cove-Smith (1995) realizou estudo em que comparou a determinação de ZPP com a da ferritina em 78 pacientes humanos que eram tratados com hemodiálise, não sendo encontrada nenhuma correlação significativa entre essas variáveis. Braun et al. (1997) em um outro estudo não verificaram correlação entre a determinação de ZPP e a porcentagem de eritrócitos hipocrômicos, também em pacientes humanos que eram tratados com hemodiálise.

A relação μmol de ZPP/mol de heme pode ser mensurada através de hematofluorometria, conforme descrito por vários autores (BLUMBERG et al., 1977; LAMOLA; EISINGER; BLUMBERG, 1980; WONG et al., 1996; MAFRA; COZZOLINO, 2000), sendo que alguns trabalhos pioneiros relataram como ponto negativo à sua utilização a influência de componentes do plasma sobre a mensuração, especialmente a bilirrubina e uréia (BURHMANN; MENTZER; LUBIN,

1979; LAMOLA; EISINGER; BLUMBERG, 1979). Por esse motivo recomenda-se que a lavagem das hemácias em solução fisiológica deva preceder a leitura, procedimento este que comprovadamente reduz a influência de tais fatores, procedimento também confirmado por outros autores (HATHERLY et al., 2009; BOMBARDELLI et al., 2010; SANTOS et al., 2012).

Diversos estudos foram realizados na medicina humana para avaliar o potencial da determinação da ZPP como teste inicial na avaliação do “*status*” do ferro no organismo, principalmente em crianças, mulheres grávidas, pacientes de hemodiálise e doadores de sangue (LABBÉ, 1992; BRAUN et al., 1996; BRAUN, 1999; LABBÉ; VREMAN; STEVENSON, 1999; MAFRA; COZZOLINO, 2000; BAART et al., 2013).

Segundo Garrett e Worwood (1994) a eritropoiese deficiente de ferro pode ocorrer tanto em pacientes com adequadas teores de ferro sérico como naqueles com concentrações reduzidas. Estes autores constataram em seu trabalho que a determinação da ZPP é simples, precisa e reprodutível, com boa sensibilidade no diagnóstico da anemia ferropriva, uma vez que encontraram uma correlação significativa entre os níveis de ZPP e o percentual de células hipocrômicas em pacientes com artrite reumatóide e também em pacientes com insuficiência renal submetidos à diálise e ao recebimento de eritropoietina. No entanto, nestes últimos os níveis de ZPP foram elevados em quase todos os pacientes, sugerindo que pode haver interferência de outros metabolitos no ensaio. Tal fato pode ser superado pela lavagem das hemácias antes da leitura em hematofluorômetro.

Paszowska et al. realizaram um estudo em 1997 onde compararam a determinação da ZPP com outros testes comumente utilizados para o diagnóstico da deficiência de ferro, a saber: ferro e ferritina séricos e taxa de hemoglobina. Os resultados apresentados confirmaram que trinta e cinco dos noventa e seis pacientes estudados possuíam uma depleção de ferro, e que também os valores mais elevados de ZPP foram encontrados nestes mesmos pacientes. Entretanto vale ressaltar que neste mesmo estudo pacientes que possuíam anemias associadas à doenças crônicas apresentaram valores de ZPP elevados associadas às concentrações fisiológicas de ferro e ferritina séricos.

Em 1993 Hastka et al. também descreveram a utilização da mensuração da ZPP em anemias associadas às doenças crônicas, muitas vezes causadas por alterações no metabolismo do ferro. Os 19 pacientes estudados tinham o

diagnóstico de artrite reumatoide (9), polimialgia reumática (3), polimiosite (1), lupus eritematoso (1), tuberculose (3), sarcoidose (1) e endocardite (1), e em todos os casos os valores de ZPP foram diminuindo com o tempo, à medida que o tratamento específico de cada doença era bem sucedido, indicando assim que a ZPP pode ser utilizada para monitorar a terapia de doenças inflamatórias crônicas.

Os pacientes com insuficiência renal também podem apresentar seus teores de ZPP elevados, o que pode estar relacionado com diferentes mecanismos patogênicos, tais como doenças inflamatórias crônicas, envenenamento por chumbo, e presença de uremia, os quais poderiam inibir a biossíntese do heme. (HASTKA et al., 1993; BRAUN, 1999).

Segundo Braun (1999), em doentes com insuficiência renal e em pacientes com anemia causada por uma variedade de desordens crônicas são encontradas dois tipos diferentes de deficiência de ferro: (a) a deficiência de ferro absoluta e (b) deficiência relativa de ferro, ou funcional. Esta última ocorre quando o ferro, apesar de possuir estoques adequados, não é disponibilizado rapidamente o suficiente para os eritroblastos (LABBÉ, 1992). Assim, a determinação da ZPP não é apenas indicativa de deficiência absoluta de ferro, mas também é o melhor indicador da eritropoiese com deficiência de ferro, juntamente com o percentual de glóbulos vermelhos hipocrômicos. Por outro lado, a ferritina sérica e saturação de transferrina não podem avaliar adequadamente esta deficiência funcional de ferro.

Tal afirmação é sustentada também por Rettmer et al. (1999), os quais realizaram um estudo para avaliar o uso da determinação da zinco protoporfirina no diagnóstico da anemia ferropriva em crianças antes do aparecimento da sintomas detectáveis no exame físico, concluindo também que na eritropoiese deficiente em ferro a ZPP se mostrou um indicador mais sensível que a mensuração da ferritina plasmática, podendo ser utilizada em adultos ou crianças para detectar uma deficiência de ferro tanto absoluta quanto funcional.

Em um estudo realizado com quinze crianças que nasceram prematuras, de modo semelhante, foram avaliados a ZPP assim como a ferritina plasmática e o hemograma (WINZERLING; KLING, 2001). As amostras de sangue foram colhidas no momento da alta hospitalar e os resultados comprovaram que a relação ZPP/heme possuía correlação direta com o número de reticulócitos e a variação percentual do tamanho das hemácias (anisocitose) mensurada através do RDW (red cell distribution width). Desta forma os autores também concluíram que a ZPP pode

fornecer uma medida simples para o diagnóstico da anemia ferropriva em neonatos prematuros.

Em 2003, Juul et al. utilizaram a ZPP como indicador do status de ferro em pacientes internados na UTI neonatal, estabelecendo os valores normativos para estes e então avaliando a utilidade deste teste como avaliador da anemia ferropriva. Descobriram que as concentrações de ZPP em neonatos são maiores que em humanos adultos e também encontraram uma correlação negativa da ZPP com a idade gestacional, ou seja, quanto mais prematuro o neonato, menores os teores de ferro e, conseqüentemente, maior a ZPP ($p < 0,001$ e $r = - 0,72$).

Ainda em relação às doenças crônicas, Saravana e Rai (2007) defendem a utilização da mensuração da ZPP no auxílio do tratamento de pacientes com artrite reumatoide. Estes autores citam o trabalho de Swaak (2006) o qual concluiu que a anemia da doença crônica é a causa mais comum de anemia em pacientes com artrite reumatoide, e que seu diagnóstico mais preciso é estabelecido através da avaliação dos estoques de ferro no aspirado de medula óssea, conforme descrito por Polleto (2010). Entretanto, Saravana e Rai (2007) chamam a atenção de que o método retrocitado não pode ser utilizado rotineiramente em pacientes com suspeita de deficiência de ferro e concluem que a determinação da ZPP além de barata é não invasiva, justificando assim que mais estudos são necessários.

Harthoorn-Lasthuizen, Lindemans e Langenhuijsen (1998) estudaram a utilização da ZPP como teste de triagem em mulheres doadoras de sangue. Segundo os autores, a anemia ferropriva é o principal fator limitante de doações seriadas, uma vez que este procedimento provoca perdas consideráveis do estoque de ferro. Para este estudo utilizaram 102 doadoras comparando os níveis de ZPP com a ferritina sérica, sendo que a primeira apontou um valor preditivo de 75% contra apenas 26% da ferritina, como diagnóstico de eritropoiese deficiente por depleção de ferro após a primeira ou segunda doação. Assim, os autores concluíram que os doadores devem ser protegidos do aparecimento da anemia ferropriva, e que a mensuração das concentrações de hemoglobina associada à ZPP pode ser de importante valia na identificação de doadores que necessitem de suplementação de ferro.

Em um estudo mais recente, Baart et al. (2013) incluíram as análises de ZPP nos exames prévios de 4.598 indivíduos doadores de sangue. Dentre estes, cerca de 3% foram recusados como doadores, por possuírem níveis de hemoglobina

abaixo do padrão de normalidade. Nestes indivíduos a utilização da ZPP melhorou o modelo estatístico utilizado para recusa dos doadores, confirmado pela concordância e benefício clínico encontrados.

Myers, Walker e Davies (2002) também constataram que a mensuração da ZPP além de ser um teste rápido e barato pode detectar precocemente a anemia ferropriva. Em seu estudo compararam os resultados de amostras de sangue de 1085 pacientes com suspeita de falha na eritropoiese por deficiência de ferro e, para tanto, mensuraram não somente a ZPP como também a ferritina sérica. Eles concluíram que o uso da primeira como triagem pode reduzir em 70% a necessidade de utilização da ferritina, ficando restrita apenas aos casos duvidosos, resultando em economia significativa sem, no entanto, perder o poder do diagnóstico clínico.

Em 2005, Zimmermann et al. estudaram 2814 crianças do continente africano, com idades variando entre 5 e 15 anos de idade, a fim de avaliar a utilização da ZPP como previsor da anemia por deficiência de ferro. Encontraram valores de sensibilidade e especificidade variando entre 60% e 80%, comprovando também com isto o valor preditivo do teste como triagem.

De forma semelhante, Kling (2006) também reafirma a utilização da ZPP no diagnóstico da anemia ferropriva em neonatos prematuros através de uma minuciosa revisão de literatura, também expondo o teste como rápido, barato e eficiente, sugerindo que o mesmo fará parte da rotina clínica no cenário atual.

Em outro estudo realizado por Miller, Mcpherson e Juul (2006), a determinação dos teores de ZPP foi utilizada para avaliar o sucesso do tratamento da anemia ferropriva em neonatos prematuros, realizado através de suplementação com sulfato ferroso. Os resultados demonstraram que os pacientes que receberam a suplementação (n=16) possuíam valores inferiores de ZPP aos daqueles que não receberam o tratamento (n=16), apresentando diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Em estudo mais recente, Miller (2013) determinou o efeito da suplementação de ferro em doses progressivamente maiores sobre a mensuração da ZPP em crianças até 2 anos de idade, concluindo que este método diagnóstico pode não ser um marcador confiável quando utilizado em curtos espaços de tempo durante a suplementação do paciente com sulfato ferroso.

Ainda em estudo associado às anemias, Estévez et al. (2009) avaliou o valor diagnóstico da zinco protoporfirina como estratégia de triagem frente à alfa talassemia. A talassemia é uma doença hereditária autossômica recessiva

caracterizada por redução da taxa de síntese de uma das cadeias de globina que formam a hemoglobina, resultando em sintomas de anemia. Geralmente são empregados testes como a avaliação do VCM, das concentrações de hemoglobina e a tipagem sanguínea para se avaliar a necessidade ou não da análise do DNA. Neste estudo os autores avaliaram os valores da ZPP em 200 pacientes e concluíram que este método pode ser utilizado como nova estratégia de rastreamento da doença.

Em 2008, Baumann-Blackmore et al. avaliaram a determinação dos valores de ZPP e da ferritina sérica no sangue extraído do cordão umbilical de recém-nascidos afro-americanos e hispânicos saudáveis, comparando os mesmos com neonatos caucasianos. Os resultados comprovaram que nos dois primeiros grupos os valores de ZPP foram maiores e a ferritina plasmática inferior em relação ao último grupo, apoiando a viabilidade de triagem em recém-nascidos de risco para deficiência de ferro no momento do nascimento.

Yu (2011) apresentou um estudo no qual propôs avaliar de maneira sistemática a sensibilidade e especificidade da ZPP frente à deficiência de ferro em crianças com idade pré-escolar. Para isso ele se utilizou de 95 pacientes entre 3 e 6 anos de idade, sendo que foram analisadas as amostras de sangue para a taxa de hemoglobina, ferritina sérica e saturação da transferrina, além da zinco protoporfirina. Nos resultados apresentados, a determinação da ZPP se mostrou um teste mais sensível para a deficiência de ferro quando comparado à mensuração das concentrações de hemoglobina ou ferritina sérica, identificando corretamente mais que o dobro das crianças com deficiência de ferro (sensibilidade de 91,7%, em comparação a 41,7% para hemoglobina e ferritina). No entanto, a ZPP apresentou menor especificidade (60,2% em comparação com 89,1% para a hemoglobina ou 96,4% para ferritina) e resultou na falsa identificação de mais suspeitos que realmente não apresentavam deficiência de ferro. Mesmo assim, os autores concluem que o método deve ser utilizado na triagem desta enfermidade, em função da praticidade, custo e ótima relação sensibilidade/especificidade.

Com o mesmo objetivo, Das e Philip (2008) compararam a sensibilidade e especificidade da mensuração da ZPP de 107 amostras, a fim de comparar com os índices de ferro no aspirado de medula óssea, considerado o teste de ouro para o diagnóstico da anemia ferropriva. A especificidade encontrada foi de 77,8% e sensibilidade de 69,8%, respectivamente. No entanto, a sensibilidade no diagnóstico

aumentou para 96,2% quando junto à ZPP foram incluídos no exame as avaliações das concentrações de hemoglobina e do número de hemácias.

Mais recentemente, em estudo realizado por Magge et al. (2013) foram avaliados o hemograma e a ZPP de 2.612 crianças provenientes de regiões de baixa renda, com idades variando entre 8 e 18 meses de idade, das quais 1.254 (48%) apresentaram valores de ZPP abaixo do normal. Dentro deste último grupo, 18% precisaram de tratamento à base de suplementação com ferro, apresentando também uma correlação significativa entre a terapia e a diminuição dos valores de ZPP.

De modo similar, Rettmer et al. (1999) também analisaram o sangue de 360 pacientes com idades variando entre 9 meses e 18 anos de idade, sendo avaliados além da ZPP o hematócrito, a taxa de hemoglobina, concentração de ferritina e saturação de transferrina sérica. Os autores encontraram diferenças relacionadas ao sexo e à idade dos indivíduos, porém os resultados demonstraram que tanto o uso da ZPP quanto o da ferritina identificaram a mesma proporção de pacientes com deficiência de ferro (3% - 4%), também comprovando a valorização deste teste na rotina de triagem clínica, justificada especialmente pelo seu baixo custo e feita rápida.

Baker (2013) cita a importância da utilização da zinco protoporfirina não somente para o diagnóstico da anemia ferropriva, mas principalmente para o diagnóstico da deficiência de ferro em indivíduos na fase infantil, uma vez que os baixos teores desse mineral também estão associados ao aparecimento de dificuldades no desenvolvimento neurológico, confirmando e defendendo assim a sua utilização além do acompanhamento dos casos de deficiência de ferro sem anemia, como aqueles apresentados por Magge et al. (2013).

Dessa maneira, apesar da ZPP não refletir o estoque de ferro como um todo, é considerada como uma prova altamente sensível e específica da deficiência absoluta de ferro, sendo sugerida como um teste de rotina (BRAUN et al., 1996; LABBÉ; VREMAN; STEVENSON, 1999). A determinação de ZPP é adequada para uma avaliação de rotina, pois se trata de um teste rápido, pouco oneroso, que requer uma amostra mínima de sangue venoso e apresenta maior acurácia do que a determinação de hemoglobina (LABBÉ, 1992).

Os teores de ZPP foram descritos em humanos, de acordo com Schifman e Finley (1981), considerando os valores normais de ZPP para os homens entre 25 e

57 μmol ZPP/mol heme e para as mulheres de 29 a 50 μmol ZPP/mol heme. A determinação de ZPP também pode ser utilizada como critério para selecionar quais pacientes devem receber tratamento com suplementação de ferro na medicina humana (BRAUN et al., 1996). Hastka et. al., (1993) referem que valores acima de 40 μmol ZPP/mol heme são indicativos de alterações no metabolismo do ferro.

Estudos também sugerem a utilização da determinação da ZPP como teste inicial para investigação de intoxicação por chumbo, por conta da sua interferência com o processo de eritropoiese (RONDÓ et al. 2006). Os resultados encontrados apontam que o chumbo apresenta associação positiva com os teores de ZPP ($p < 0,004$) e que a intoxicação por este mineral está relacionada ao processo anêmico.

Em revisão realizada por Molin, Paoliello e Capitan (2006) acerca da utilização da mensuração da ZPP em pacientes intoxicados por chumbo, os autores assinalam que durante os últimos anos uma grande variedade de biomarcadores foram propostos para avaliar a exposição ao mesmo, porém destacam a facilidade e baixo custo da técnica da ZPP. Há também de se considerar que alguns autores ainda julgam a ZPP um biomarcador útil na correlação com os teores de chumbo no sangue, especialmente na triagem de grandes grupos expostos a esse metal pesado, sendo boa ferramenta para a avaliação dos trabalhadores com exposição ocupacional ao chumbo.

Em outro relato, pesquisadores apresentaram os resultados do uso da determinação da ZPP em associação com a determinação dos teores de chumbo no sangue total de um indivíduo com dois episódios de intoxicação aguda por este metal pesado, juntamente com uma revisão de literatura sobre o uso da ZPP (MARTIN; WERNTZ III; DUCATMAN, 2004). Concluíram que a mensuração da mesma tem utilidade clínica em casos de superexposição, fornecendo inclusive informações sobre o tempo que uma pessoa foi exposta ao chumbo. No entanto, afirmam que este teste pouco contribui para os programas de rastreio, devido à sua pequena sensibilidade na identificação de indivíduos na faixa de baixa exposição ao chumbo.

Carvalho et al. (1996) realizaram um estudo epidemiológico para avaliar a intoxicação por chumbo em 101 crianças, com idades variando entre um e cinco anos, residentes num raio de 500 metros de uma fundição de chumbo, a qual funcionava desde 1960 na cidade de Santo Amaro da Purificação - BA. Para tanto realizaram a dosagem da zinco protoporfirina, comparando os resultados com

aqueles de 98 crianças de uma creche, sadias e não expostas ao chumbo, da mesma faixa etária, na cidade de Salvador - BA. No primeiro grupo, os valores médios da ZPP foram de 65,5 mg/dL, enquanto no grupo controle a média foi de 31,0 mg/dL. Evidenciaram ainda que valores de ZPP “extremamente elevados” (acima de 156,0 mg/dL) foram observados em 8% das crianças expostas à potencial fonte de chumbo e em nenhuma (0%) das crianças de Salvador, sendo a diferença estatisticamente significativa. Verificaram adicionalmente que quadros de anemia foram descritos em 35,0% das crianças do primeiro grupo pesquisado e em 25,5% das crianças do grupo controle, destacando que o grupo de crianças com um ano de idade foi aquele com teores mais elevados de ZPP e maior frequência de anemia.

Poucos são os estudos encontrados na literatura especializada que tentaram vulgarizar na veterinária a aplicação da determinação da zinco protoporfina, tal como feita na medicina humana. Entretanto algumas pesquisas foram realizadas nas últimas três décadas.

Em 1981 foi relatado um caso de intoxicação por chumbo em um potro, o qual apresentou teores sanguíneos deste analito da ordem de 40 $\mu\text{g/dL}$ (KOWALCZYK; NAYLOR; GUNSON, 1981) A partir desta constatação os autores compararam as concentrações de ZPP deste animal intoxicado com aquelas de 10 equinos sadios. Os resultados mostraram um valor de 634 $\mu\text{g/dL}$ no potro intoxicado, contra um valor médio de 73 $\mu\text{g/dL}$ nos animais sadios, concluindo que, tal como na espécie humana, a ZPP pode ser utilizada nos equinos como um indicador bioquímico da intoxicação por chumbo, mesmo antes do aparecimento dos sintomas clínicos do saturnismo, podendo a constatação ser extrapolada para outras espécies animais.

Ainda em 1981, George e Duncan avaliaram os valores da protoporfirina eritrocitária (PPE) em 15 bezerros sadios, encontrando média e desvio padrão de 142,8 $\mu\text{g/dL}$ e 32,4 $\mu\text{g/dL}$, respectivamente. A PPE pode ser encontrada sob duas formas: a protoporfirina eritrocitária livre, disponível para o ferro (PEL) ou zinco protoporfirina (ZPP). Estudaram também três animais que receberam a administração oral quinzenal de chumbo, que resultou em um aumento contínuo da PPE que variou entre 2.800 $\mu\text{g/dL}$ e 6.033 $\mu\text{g/dL}$, após 20 semanas, sendo que encontraram nestas amostras de PPE a proporção de 2:1 entre ZPP e PEL, respectivamente. Ao final do experimento foi observado também o aparecimento de anemia de grau leve em dois destes três animais intoxicados.

Mehennaoui et al. (1988) também realizaram um estudo no qual quatro novilhas foram submetidas a uma dieta com feno contaminado com chumbo (Pb), zinco (Zn) e cádmio (Cd) na proporção de 500 g de feno para cada 100 kg de peso corporal por um período de 17 semanas. Após a dieta, estes animais foram acompanhados por 10 meses para se estudar a queda dos indicadores de exposição, utilizando-se a avaliação das concentrações de ZPP como padrão de eliminação do chumbo sanguíneo, verificando-se uma queda muito lenta dos seus teores.

Em outro estudo similar sobre os efeitos de uma grave intoxicação por chumbo em bovinos, consequência do fornecimento de ração contaminada em outubro de 1989 em duas propriedades leiteiras na Holanda, Wijbenga et al. publicaram os seus resultados em 1992. Vacas e bezerros foram afetados, sendo que as manifestações clínicas foram observadas e as amostras de sangue foram colhidas para a avaliação do hemograma, da ZPP, e dos teores de chumbo. Em decorrência do erro 40% das vacas afetadas tiveram de ser abatidas, tendo os pesquisadores concluído que as concentrações de zinco protoporfirina eritrocitária pareciam melhor coincidir com os sintomas clínicos da intoxicação, do que os próprios teores de chumbo encontrados no sangue, sugerindo os resultados que a ZPP pode ser um preditor útil para os efeitos posteriores da intoxicação por chumbo.

Ainda em estudos sobre intoxicação por chumbo em animais, Ambrogi et al. (1996) apresentaram os resultados do uso da ZPP como marcadora da intoxicação por chumbo em condições de baixa exposição ao chumbo ambiental. Para tal analisaram as relações entre os baixos teores de chumbo no sangue e ZPP em uma população de 79 cães saudáveis que viviam em uma área urbana italiana. Cada amostra foi testada para chumbo, ZPP e hemograma, além das enzimas AST, ALT e teores de ureia, e não verificaram relação entre as concentrações de ZPP e os teores de chumbo no sangue total.

Em 1992, Hawke et al. determinaram as concentrações de chumbo e de protoporfirina eritrocitária (PPE) no sangue de 91 gatos clinicamente sadios, que viviam em uma área suburbana de Sydney, na Austrália. A concentração média encontrada para as concentrações de PPE foi de 22,34 $\mu\text{g/dL}$, com desvio padrão de 18,1 $\mu\text{g/dL}$. Os teores também foram monitorados em três gatos com intoxicação por chumbo confirmada, sendo realizadas as colheitas no momento do diagnóstico, uma

semana e um mês após a terapia de quelação com o cálcio. Os valores de PPE encontrados foram mais elevados em uma semana após o tratamento do que quando do diagnóstico em dois dos três animais. Um mês depois da terapia as concentrações de PPE foram normais em dois gatos, mas ainda substancialmente elevadas no terceiro animal, apesar da taxa sanguínea de chumbo ter voltado ao intervalo de normalidade e todas as manifestações clínicas de intoxicação terem desaparecido. Apesar de quase a totalidade da protoporfirina mensurada neste estudo estar presente sob a forma de ZPP, os pesquisadores concluíram que o teste tem valor limitado no diagnóstico da toxicidade aguda por chumbo e no controle do sucesso da terapia de quelação em gatos.

Waki et al. realizaram um estudo em 2008 com o objetivo de avaliar os teores da ZPP eritrocitária em gatos domésticos clinicamente saudáveis, utilizando 22 animais, machos e fêmeas de raças variadas, com idades entre um e quinze anos. Na mensuração da ZPP o valor da média observado foi de 40,7 $\mu\text{mol ZPP / mol heme}$, com desvio padrão de 13,5 $\mu\text{mol ZPP / mol heme}$, e variação de valores máximo e mínimo de 74,0 e 19,3 $\mu\text{mol ZPP / mol heme}$, respectivamente. Com base nesses resultados, verificou-se a viabilidade da mensuração da ZPP em felinos, sendo que os valores encontrados nesses animais foram semelhantes aos relatados na espécie humana (homens: 25 a 57 $\mu\text{mol ZPP / mol heme}$; mulheres: 29 a 50 $\mu\text{mol ZPP / mol heme}$), conforme descrito por Schifman e Finley (1981).

Apesar do potencial de uso dessa técnica no campo clínico, a mesma ainda é pouco empregada, principalmente na medicina veterinária. Estudos comprovam a eficácia da mensuração das concentrações da ZPP tanto como biomarcadora da intoxicação por chumbo (CARVALHO et al., 1996; MARTIN; WERNTZ III; DUCATMAN, 2004; MOLIN; PAOLIELLO; CAPITAN, 2006) quanto como previsor dos quadros de anemia ferropriva em humanos (GARRETT; WORWOOD, 1994; HARTHOORN-LASTHUIZEN; LINDEMANS; LANGENHUIJSEN, 1998; RETTMER et al., 1999; WINZERLING; KLING, 2001; WALKER; DAVIES, 2002; JUUL et al., 2003; KLING, 2006; MILLER; McPHERSON; JUUL, 2006; DAS; PHILIP, 2008; MAGGE et al., 2013; MYERS; BAKER, 2013). Entretanto, para que a técnica seja utilizada na rotina clínica, faz-se necessário a padronização do seu intervalo normal de variação para cada espécie a ser avaliada. Desse modo, valemo-nos do presente estudo não somente para determinar quais são os valores fisiológicos das concentrações da zinco protoporfirina eritrocitária em bezerros da raça Holandesa com até 30 dias de

vida, mas também para avaliar o uso desta ferramenta diagnóstica em casos de anemias ferroprivas que acometem estes neonatos bovinos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para este estudo foram utilizados 302 bezerros da raça holandesa, com idades variando do nascimento até 30 dias de vida, provenientes de fazendas produtoras de leite localizadas no Estado de São Paulo, dos quais foram selecionados 30 animais (sadios) para a padronização dos valores da zinco protoporfirina eritrocitária. Dentre os 302 animais estudados, apenas 67 animais apresentaram-se anêmicos, sendo estes selecionados juntamente com outros 67 animais hígidos, de idades equivalentes em dias, para a composição dos 134 animais (67 sadios e 67 anêmicos) utilizados para a avaliação da zinco protoporfirina como previsor da ocorrência de anemia ferropriva. Os demais animais foram descartados da composição dos grupos. Nas propriedades, para seleção dos bezerros sadios e anêmicos, os mesmos foram submetidos à avaliação física, considerando-se no exame: as funções vitais, estado de hidratação, coloração de mucosas aparentes, ocorrência de enfermidades entéricas, respiratórias, umbilicais e particulares evidências de anemia. Os métodos utilizados com essa finalidade foram aqueles recomendados e utilizados rotineiramente na Clínica de Ruminantes do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, que seguem critérios estabelecidos por Dirksen et al., (1993). A identificação dos animais anêmicos foi realizada por meio das manifestações clínicas (mucosas hipocoradas ou amareladas; taquicardia; taquipnéia; sopro anêmico, etc.), e resultados da avaliação dos componentes do eritrograma para a evidenciação de neonatos nos quais o exame físico não permitiu o diagnóstico seguro da anemia. Com tal finalidade, considerou-se o critério estabelecido por Tennant, Harrold e Reina-Guerra (1975) e utilizado por Benesi et al. (2000), ou seja, o volume globular inferior a 25%. O quadro anêmico foi classificado quanto ao seu caráter regenerativo e morfo-tintorial, segundo critérios estabelecidos por Jain (1986), sendo descartados todos os animais que possuíam anemia originada por hemoparasitas.

Para constituição dos grupos experimentais os animais foram classificados em anêmicos (grupo com anemia - composto por 67 animais, com volume globular menor que 25%), e sadios (grupo controle - também composto por 67 animais, estabelecido por meio de critérios clínicos e o valor do volume globular variando entre 25% e 40%), conforme explicitado no quadro 1.

Quadro 1 - Constituição dos grupos de bezerros, segundo os valores do Volume Globular (VG), para avaliação do hemograma e do número de reticulócitos, dosagens dos valores séricos de ferro, de bilirrubinas e de ureia, e determinação da zinco protoporfirina

Grupos		Descrição / Intervalo do Volume Globular	Número de animais
Com anemia	A N Ê M I C O S	Bezerros anêmicos (VG < 25%)	67
Controle	S A D I O S	Bezerros sadios (VG variando entre 25% e 40%)	67

Fonte: (SANTOS, R.B., 2013).

3.2 HEMOGRAMA E RETICULOCITOMETRIA

As amostras de sangue foram colhidas através de punção da veia jugular externa usando-se sistema a vácuo, em tubo siliconizado com EDTA tripotássico na proporção de 1,5 mg/mL de sangue (capacidade para 5 mL de sangue) e agulha para múltiplas colheitas (25mm x 0,8mm) do sistema Vacutainer®. As amostras foram refrigeradas a 4°C até o momento do exame, e os esfregaços sanguíneos, para as contagens diferenciais de leucócitos, foram confeccionados imediatamente pós colheita, com sangue fresco sem anticoagulante, segundo técnicas e padronização descritas por Birgel (1982). A hematimetria, ou seja, contagem de eritrócitos e de leucócitos, dosagem de hemoglobina e determinação do volume globular, foi realizada conforme padronizado por Birgel (1982). Os índices hematimétricos absolutos (Volume Corpuscular Médio - VCM, Hemoglobina Corpuscular Média - HCM, e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média -

CHCM) foram calculados a partir dos valores determinados do eritrograma. O processamento do material foi realizado no Laboratório Clínico de Rotina do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP.

Foi realizada também a contagem do número de reticulócitos em esfregaços sanguíneos com prévia coloração supra vital pelo novo azul de metileno a 0,5%, e submetidos à coloração pancrômica conforme método descrito por Rosenfeld (1947). Os reticulócitos foram identificados e contados, avaliando-se campos delimitados e homogêneos que continham, quando somados os números de células vermelhas, cerca de um total de 1000 hemácias em cada esfregaço sanguíneo, de acordo com as recomendações de Birgel (1982).

3.3 BIOQUÍMICA SÉRICA

Para tal finalidade, as amostras de sangue foram colhidas por meio de punção da veia jugular externa usando-se sistema a vácuo, em tubo siliconizado sem anticoagulante (capacidade para 10 mL de sangue) e agulha para múltiplas colheitas (25 mm x 0,8mm) do sistema Vacutainer®. Após a coagulação do sangue e retração do coágulo, os tubos foram centrifugados a 3500 rpm por 10 minutos com a finalidade de separar o soro sanguíneo. No soro sanguíneo assim obtido foram avaliadas os teores séricos de ferro, de bilirrubinas e a da ureia.

3.3.1 Metabolismo de ferro

O metabolismo de ferro foi analisado por meio das avaliações da concentração de ferro sérico total (FT) e capacidade total de ligação do ferro (CTLF), mediante uso de kits comerciais, através da leitura em espectrofotômetro, em comprimento de onda igual a 560 nm.

3.3.2 Dosagem de bilirrubinas séricas

As bilirrubinas total e direta (conjugada) foram quantificadas por colorimetria, utilizando-se kit comercial, conforme método descrito por Jendrassik e Grof (1938). A bilirrubina indireta (livre) foi então calculada por diferença entre os valores obtidos para as bilirrubinas total e direta, conforme técnicas empregadas na rotina do Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica / Hospital Veterinário da FMVZ-USP.

3.3.3 Dosagem da Ureia sérica

A ureia sérica foi mensurada por método enzimático com substrato contendo urease, em comprimento de onda de 340 nm, utilizando-se kit comercial (Kit Diasys 10310022).

3.4 DETERMINAÇÃO DA ZINCO PROTOPORFIRINA (ZPP)

Para a determinação da ZPP, foi utilizado kit comercial e hematofluorômetro*, por meio do qual foi induzida a excitação de luminosidade em uma ou duas camadas de eritrócitos presentes em uma gota de sangue total, disposta sobre uma lâmina transparente especialmente preparada para servir de suporte no interior do aparelho. Para tanto, foram adicionadas ao sangue, previamente, duas gotas do reagente, que após reação desencadeou a emissão de fluorescência correspondente à quantidade de ZPP presente na amostra em μmol de ZPP/mol de heme. Assim, a mensuração da ZPP eritrocitária foi realizada em aparelho de hematofluorometria, conforme descrito por Lamola, Eisinger e Blumberg (1980). A leitura da amostra foi realizada em triplicata e a média aritmética das medidas foi

* PROTOFLUOR-Z (Helena Laboratories)

considerada como o valor em μmol de ZPP/mol de heme do animal avaliado. O coeficiente de variação dos valores da triplicata encontrados foi de 0,0135.

Realizou-se a mensuração da zinco protoporfirina (ZPP) eritrocitária em 30 (trinta) bezerros clinicamente saudáveis para a padronização dos valores da zinco protoporfirina eritrocitária e em 134 bezerros (67 saudáveis e 67 anêmicos) utilizados para a avaliação da zinco protoporfirina como preditor da ocorrência de anemia ferropriva, respectivamente. Os animais foram selecionados de acordo com o resultado dos exames físicos e complementares laboratoriais. Os valores das concentrações da ZPP eritrocitária dos bezerros utilizados foram determinados em triplicata de cada uma das amostras de sangue colhidas com EDTA, as quais foram mantidas sob refrigeração em dois tempos após a colheita, ou seja, três e doze horas após a colheita do sangue.

Além da medição das concentrações da ZPP eritrocitária em gotas de sangue total, também foi medida essa concentração em gotas de suspensão de hemácias lavadas dessa mesma amostra, para que fossem retirados todos os tipos de interferência nos valores encontrados.

O procedimento de lavagem iniciou-se com centrifugação do sangue durante quatro minutos a $1000 \times g$, pouco antes da medição. Depois foi removido o plasma, sendo este substituído por solução salina isotônica (NaCl, 9 g/L) para restaurar o volume original. Este processo de lavagem foi repetido por três vezes e então realizada a mensuração da ZPP na suspensão de hemácias lavadas.

3.5 EXAME COPROPARASITOLÓGICO

As amostras de fezes para o exame coproparasitológico foram colhidas manualmente da ampola retal de cada um dos bezerros submetidos à seleção com a utilização de luvas de látex para o procedimento. O método utilizado para tal exame foi a contagem de ovos por grama de fezes (OPG), realizada de acordo com a técnica modificada de Gordon e Whitlock (1939).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos valores obtidos para os 30 animais clinicamente sadios selecionados para a padronização da ZPP, foi empregada a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o Programa estatístico Minitab[®] (2013). Ainda, foi empregado o teste de Kolmogorov-Smirnov, com o intuito de verificar se os dados obtidos apresentavam distribuição normal (gaussiana).

Foi também utilizado o programa estatístico Minitab[®] (2013) para a análise da existência de diferença estatística entre os resultados obtidos nos diferentes tempos, com e sem lavagem de hemácias, e para a verificação de associação entre os resultados de bilirrubina e de ureia séricas com aquelas obtidas na mensuração da zinco protoporfirina (ZPP) eritrocitária, sendo que para isso foram realizados o Teste T-Pareado e o Teste do Qui-quadrado, respectivamente.

Para a avaliação da zinco portoporfirina como previsor da anemia ferropriva em bezerros neonatos, a apresentação dos resultados obtidos foi efetuada através da estatística descritiva e a avaliação estatística dos mesmos, realizada pela análise de variância e posterior contraste entre médias obtidas nos bezerros sadios e anêmicos através do método de Tukey, ambos os testes com níveis de significância igual a 5% ($p < 0,05$), conforme recomendado por Berquó, Souza e Gotlies (1981). Posteriormente, foram realizados os testes de correlação de Pearson entre variáveis, a fim de se descobrir uma possível correlação linear entre as mesmas, seguida pela análise de regressão das variáveis correlacionadas. A realização dos testes estatísticos e interpretação dos resultados foi também efetuada com o auxílio do programa estatístico computadorizado Minitab[®] (2013).

4 RESULTADOS

4.1 PADRONIZAÇÃO DOS VALORES DA ZINCO PROTOPORFIRINA ERITROCITÁRIA EM BEZERROS CLINICAMENTE SADIOS

Os resultados dos valores das médias aritméticas individuais da ZPP eritrocitária obtidos por mensurações em triplicata de cada amostra de sangue dos trinta bezerros clinicamente sadios estudados, segundo o momento pós-colheita e a lavagem prévia ou não das hemácias, são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Valores das médias aritméticas individuais obtidas a partir das mensurações em triplicata de cada amostra de sangue, com hemácias lavadas ou não em dois momentos pós colheita (p.c.), para o teor de zinco protoporfirina eritrocitária (ZPP $\mu\text{mol/ mol de Heme}$) de bezerros clinicamente sadios (n=30) do Estado de São Paulo - 2013

Animais Nº	Medidas da ZPP – Hemácias não lavadas (ZPP $\mu\text{mol/ mol de Heme}$)	Medidas da ZPP – Hemácias lavadas (ZPP $\mu\text{mol/ mol de Heme}$)	Medidas da ZPP – Hemácias lavadas (ZPP $\mu\text{mol/ mol de Heme}$)
	3 horas p.c.	3 horas p.c.	12 horas p.c.
1	83	62	66
2	56	45	44
3	120	112	109
4	135	117	122
5	71	56	60
6	80	64	66
7	62	43	43
8	55	40	42
9	139	103	107
10	84	57	58
11	51	26	26
12	56	33	33
13	93	58	59
14	77	59	58
15	58	47	46
16	51	34	33
17	51	28	26
18	81	47	43
19	80	63	62
20	76	60	60
21	94	72	69
22	55	35	31
23	60	46	44
24	69	57	54
25	93	76	76
26	88	72	69
27	111	92	90
28	93	74	73
29	102	76	75
30	103	88	87

Fonte: (SANTOS, R.B., 2013).

Na tabela 2 são apresentados os valores das médias e seus desvios padrão, das medianas, dos resultados do teste de normalidade, dos valores de "p", do erro padrão das médias e do intervalo de variação da média. O teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) indicou que os dados obtidos apresentavam distribuição normal (gaussiana).

Tabela 2 - Valores das médias e desvios-padrão, medianas, erro padrão das médias, valores máximo e mínimo da zinco protoporfirina eritrocitária (μmol de ZPP/mol de heme) obtidos de amostras de sangue colhidas com EDTA, lavadas previamente ou não, em dois momentos pós colheita (p.c.) de bezerros clinicamente saudáveis do Estado de São Paulo - 2013

Variáveis	Tratamentos das amostras e tempo de armazenamento após a colheita		
	Amostras não lavadas 3 horas p.c.	Amostras lavadas 3 horas p.c.	Amostras lavadas 12 horas p.c.
Número de amostras	30	30	30
Médias	80,90	61,40	61,03
Medianas	80,00	58,50	59,50
Desvios padrão	24,36	23,68	24,35
Erro padrão da média	4,45	4,32	4,45
Valores mínimos	51	26	26
Valores máximos	139	117	122
Teste de normalidade (K-S)	0,11	0,12	0,11
Valor de p no teste de normalidade	> 0,10	> 0,10	> 0,10
Distribuição normal dos dados?	Sim	Sim	Sim

Fonte: (SANTOS, R.B., 2013).

Ao se comparar as médias de ZPP eritrocitária obtidas na mensuração das amostras de sangue total em suspensão de hemácias lavadas ou não no mesmo momento, ou seja, 3 horas p.c., verificou-se a existência de diferença estatística significativa entre elas (Teste T-Pareado: $p < 0,01$). Para isso foram realizados o teste de normalidade, o teste de igualdade das variâncias e o teste T-pareado.

A análise estatística realizada com os dados referentes aos valores da ZPP eritrocitária em relação ao tempo de armazenamento das amostras demonstrou que não houve diferença significativa ao compararem-se as médias de ZPP mensuradas

em suspensão de hemácias lavadas, 3 horas e 12 horas p.c. (Teste T-Pareado: $p > 0,05$).

A análise estatística realizada para a verificação de associação entre os valores de bilirrubina total e da mensuração da ZPP eritrocitária demonstrou que não há relação entre elas (Teste qui-quadrado: $p > 0,05$). Para isso foi verificada a existência de associação entre valores de bilirrubina total acima dos valores de referência e valores de ZPP eritrocitária acima da média somada com o desvio padrão de cada momento mensurado, encontrado no presente trabalho, já que não há valor de referência padronizado para ZPP eritrocitária de bezerros. Para tal análise foi realizado o teste de qui-quadrado para cada uma das mensurações (mensuração de ZPP em hemácias lavadas e não lavadas, 3 horas e 12 horas após a colheita do sangue) com a finalidade de se encontrar associação entre valores de bilirrubina alta e ZPP eritrocitária alta.

4.2 AVALIAÇÃO DA ZINCO PROTOPORFIRINA ERITROCITÁRIA COMO PREVISORA DA OCORRÊNCIA DE ANEMIA FERROPRIVA EM BEZERROS COM ATÉ UM MÊS DE VIDA.

Realizou-se a mensuração do hemograma e reticulocitometria, concentrações séricas e metabolismo de ferro, teores de bilirrubinas e de uréia séricas e da zinco protoporfirina (ZPP) de 134 bezerros da raça Holandesa com até um mês de vida, os quais foram utilizados para a formação dos grupos estudados (67 sadios - grupo controle e 67 anêmicos - grupo com anemia). Foi empregada a análise de variância entre os grupos (ANOVA), para a análise dos valores obtidos para os animais selecionados. Uma vez que o valor de “p” era inferior a 0,05, ou seja, denotando diferença, os pares de médias eram submetidos ao teste de comparação de médias de Tukey, num intervalo de confiança de 95%. Para toda estas análises foi utilizado o programa estatístico Minitab® (2013).

Os valores das médias da zinco protoporfirina, do eritrograma e reticulocitometria, assim como dos seus respectivos desvios padrão são apresentados na tabela 3. As distribuições gráficas dos valores individuais obtidos para as concentrações de zinco protoporfirina (ZPP), número de hemácias (He),

volume globular (VG) e taxa de hemoglobina (Hb) podem ser visualizadas nas Gráficos 1,2,3 e 4, respectivamente.

Tabela 3 - Valores médios e desvios padrão obtidos para as concentrações de zinco protoporfirina (ZPP) e os componentes do eritrograma: número de hemácias (He), volume globular (VG), taxa de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), e reticulocitometria em bezerros da raça Holandesa Preta e Branca, no primeiro mês de vida, agrupados segundo o volume globular, criados em fazendas produtoras de leite no Estado de São Paulo - 2013

Variáveis	Anêmicos (VG 17% - 24%)	Sadios (VG 25% - 40%)
Número de amostras	67	67
ZPP ($\mu\text{mol de ZPP/mol de heme}$)	92,07 \pm 20,35** ^a	68,40 \pm 13,92** ^b
He ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,89 \pm 0,57** ^a	7,62 \pm 0,98** ^b
VG (%)	21,12 \pm 2,13** ^a	31,29 \pm 4,38** ^b
Hb (g/dL)	6,82 \pm 0,73** ^a	9,42 \pm 1,43** ^b
VCM (fL)	36,70 \pm 4,10** ^a	41,20 \pm 3,72** ^b
HCM (pg)	11,80 \pm 1,51* ^a	12,44 \pm 1,94* ^b
CHCM (%)	32,25 \pm 2,37** ^a	30,23 \pm 3,30** ^b
Reticulócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3,30 \pm 3,70 ^a	3,21 \pm 4,57 ^a

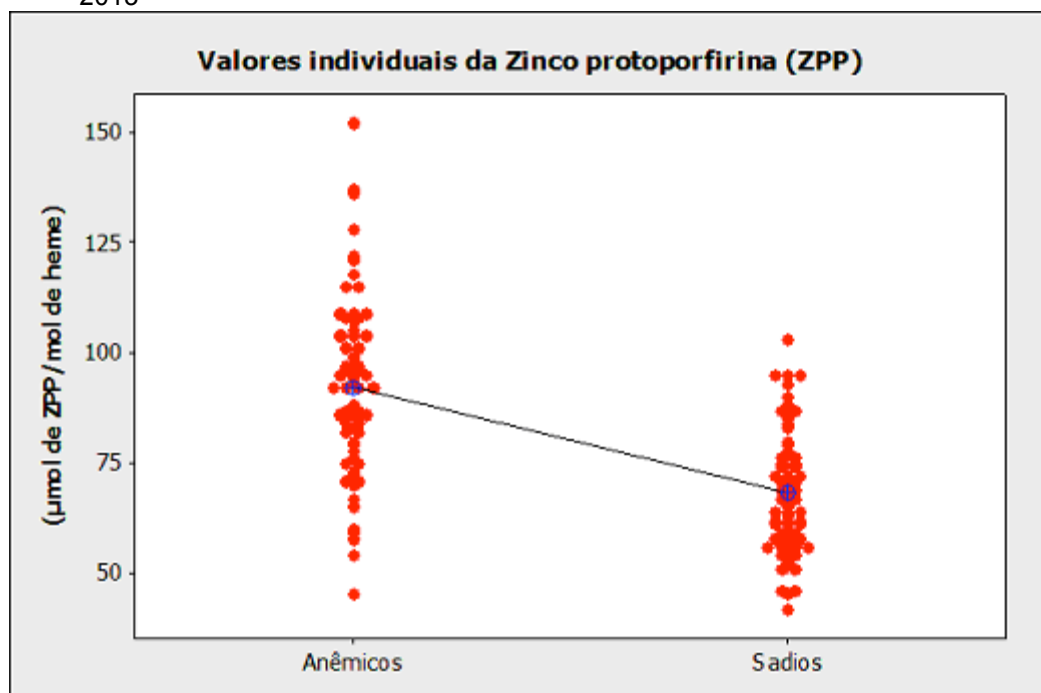
* p < 0,05 na Análise de Variância.

** p < 0,01 na Análise de Variância.

a,b: Letras não coincidentes na mesma linha denotam diferença significativa entre pares de valores no Teste de Tukey, num intervalo de confiança de 95%.

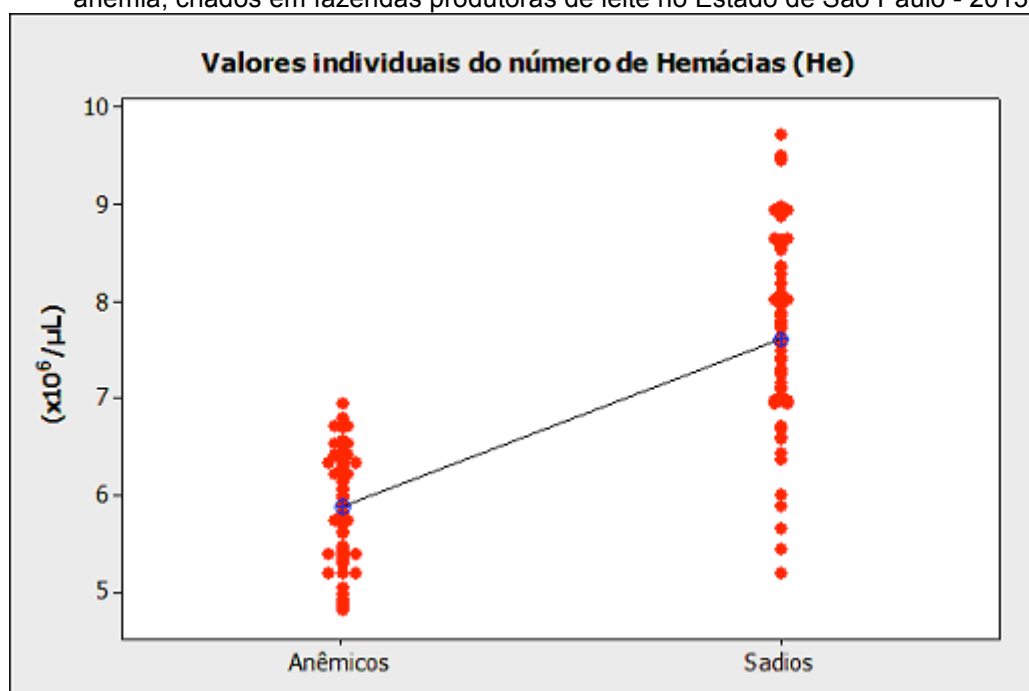
Fonte: (SANTOS, R.B., 2013).

Gráfico 1 - Distribuição dos valores individuais da zinco protoporfirina eritrocitária (ZPP) de bezerras da raça Holandesa Preta e Branca, no primeiro mês de vida, agrupados segundo presença de anemia, criados em fazendas produtoras de leite no Estado de São Paulo - 2013



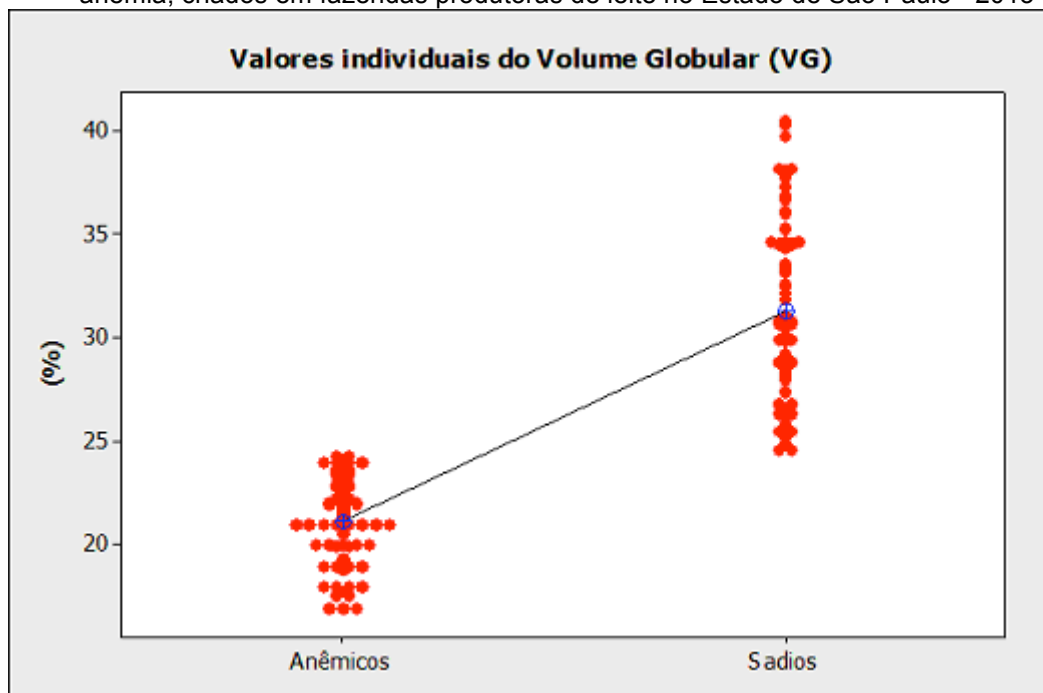
Fonte: (SANTOS, R.B., 2013).

Gráfico 2 - Distribuição dos valores individuais do número de Hemácias (He) de bezerras da raça Holandesa Preta e Branca, no primeiro mês de vida, agrupados segundo presença de anemia, criados em fazendas produtoras de leite no Estado de São Paulo - 2013



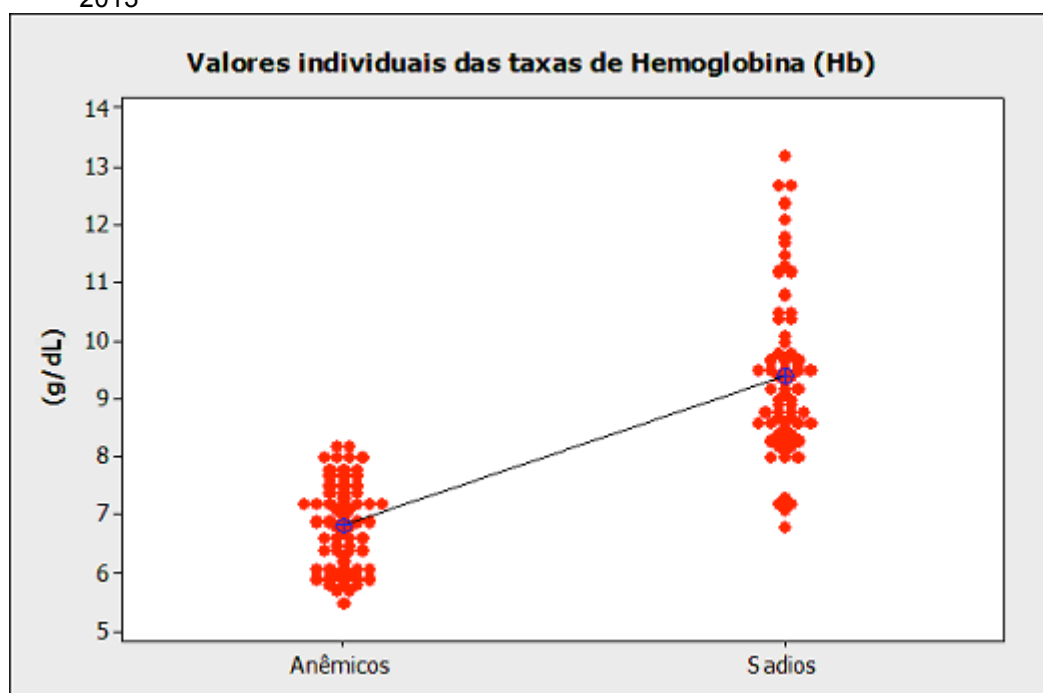
Fonte: (SANTOS, R.B., 2013).

Gráfico 3 - Distribuição dos valores individuais do Volume Globular (VG) de bezerros da raça Holandesa Preta e Branca, no primeiro mês de vida, agrupados segundo presença de anemia, criados em fazendas produtoras de leite no Estado de São Paulo - 2013



Fonte: (SANTOS, R.B., 2013).

Gráfico 4 - Distribuição dos valores individuais das concentrações de Hemoglobina (Hb) de bezerros da raça Holandesa Preta e Branca, no primeiro mês de vida, agrupados segundo presença de anemia, criados em fazendas produtoras de leite no Estado de São Paulo - 2013



Fonte: (SANTOS, R.B., 2013).

Os valores das médias dos componentes do leucograma e das análises bioquímicas (teores das avaliações do metabolismo de ferro, concentrações de bilirrubinas séricas e de uréia) e dos seus respectivos desvios padrão são apresentados nas tabelas 4 e 5. Os gráficos 5 e 6, por sua vez, representam a distribuição dos valores individuais dos teores de ferro sérico e a capacidade total de ligação do ferro, respectivamente.

Tabela 4 - Valores médios e desvios padrão obtidos para os componentes do leucograma de bezerros da raça Holandesa Preta e Branca, no primeiro mês de vida, agrupados segundo o volume globular (VG), criados em fazendas produtoras de leite no Estado de São Paulo - 2013

Variáveis	Anêmicos (VG 17% - 24%)	Sadios (VG 25% - 40%)
Número de amostras	67	67
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$8,72 \pm 2,10^a$	$8,03 \pm 2,29^a$
Neutrófilos Bastonetes ($\times 1/\mu\text{L}$)	$46,52 \pm 80,29^a$	$47,40 \pm 77,53^a$
Neutrófilos Segmentados ($\times 1/\mu\text{L}$)	3781 ± 1365^a	3828 ± 1600^a
Eosinófilos ($\times 1/\mu\text{L}$)	$30,09 \pm 41,18^a$	$35,54 \pm 47,47^a$
Basófilos ($\times 1/\mu\text{L}$)	$57,34 \pm 81,76^a$	$54,55 \pm 58,31^a$
Linfócitos Típicos ($\times 1/\mu\text{L}$)	$4335 \pm 1393^{**a}$	$3577 \pm 1482^{**b}$
Linfócitos Atípicos ($\times 1/\mu\text{L}$)	$34,40 \pm 92,90^a$	$94,90 \pm 390,70^a$
Monócitos ($\times 1/\mu\text{L}$)	$438,80 \pm 216,60^a$	$397,20 \pm 337,30^a$

* $p < 0,05$ na Análise de Variância.

** $p < 0,01$ na Análise de Variância.

a,b: Letras não coincidentes na mesma linha denotam diferença significativa entre pares de valores no Teste de Tukey, num intervalo de confiança de 95%.

Fonte: (SANTOS, R.B., 2013).

Tabela 5 - Valores médios e desvios padrão obtidos para as concentrações séricas de bilirrubinas total (BT), direta (BD) e indireta (BI), taxa de ferro total sérico (FT), capacidade total de ligação do ferro (CTLF) e ureia sérica de bezerros da raça Holandesa Preta e Branca, no primeiro mês de vida, agrupados segundo o volume globular (VG), criados em fazendas produtoras de leite no Estado de São Paulo - 2013

Variáveis	Anêmicos (VG 17% - 24%)	Sadios (VG 25% - 40%)
Número de amostras	67	67
Bilirrubina Total ($\mu\text{mol/L}$)	$6,54 \pm 2,09^a$	$6,87 \pm 2,05^a$
Bilirrubina Direta ($\mu\text{mol/L}$)	$1,12 \pm 1,24^a$	$1,45 \pm 1,11^a$
Bilirrubina Indireta ($\mu\text{mol/L}$)	$5,42 \pm 1,53^a$	$5,41 \pm 1,44^a$
Ferro Total ($\mu\text{mol/L}$)	$9,51 \pm 3,13^{**a}$	$16,71 \pm 4,46^{**b}$
Capacidade Total de Ligação do Ferro – CTLF ($\mu\text{mol/L}$)	$65,67 \pm 6,21^{**a}$	$52,76 \pm 8,03^{**b}$
Ureia (mmol/L)	$4,21 \pm 1,23^a$	$4,64 \pm 1,81^a$

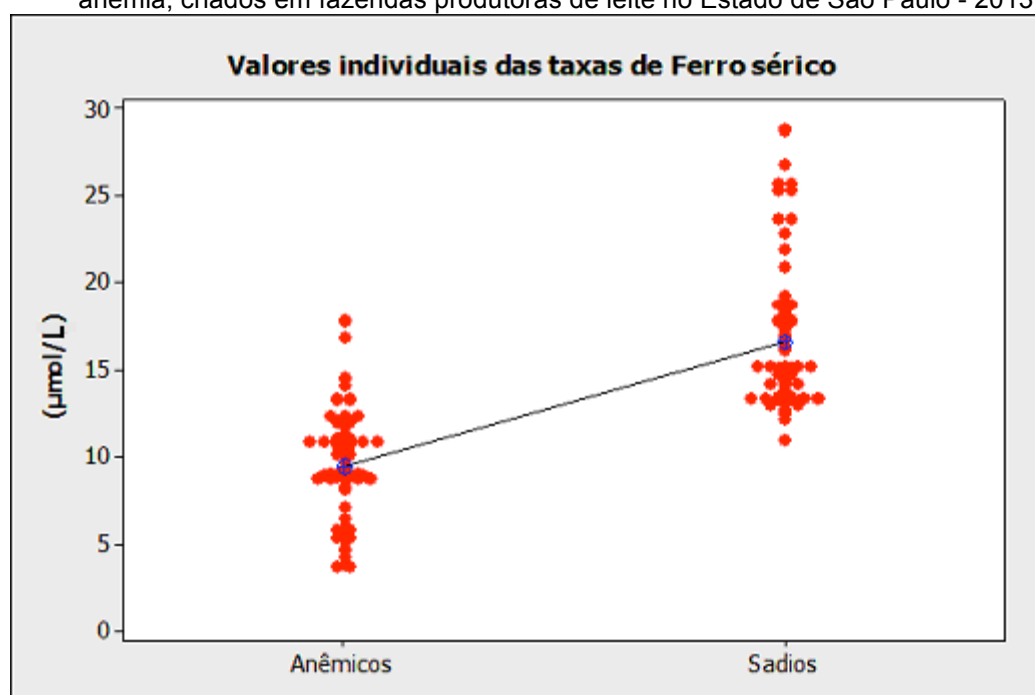
* $p < 0,05$ na Análise de Variância.

** $p < 0,01$ na Análise de Variância.

a,b: Letras não coincidentes na mesma linha denotam diferença significativa entre pares de valores no Teste de Tukey, num intervalo de confiança de 95%.

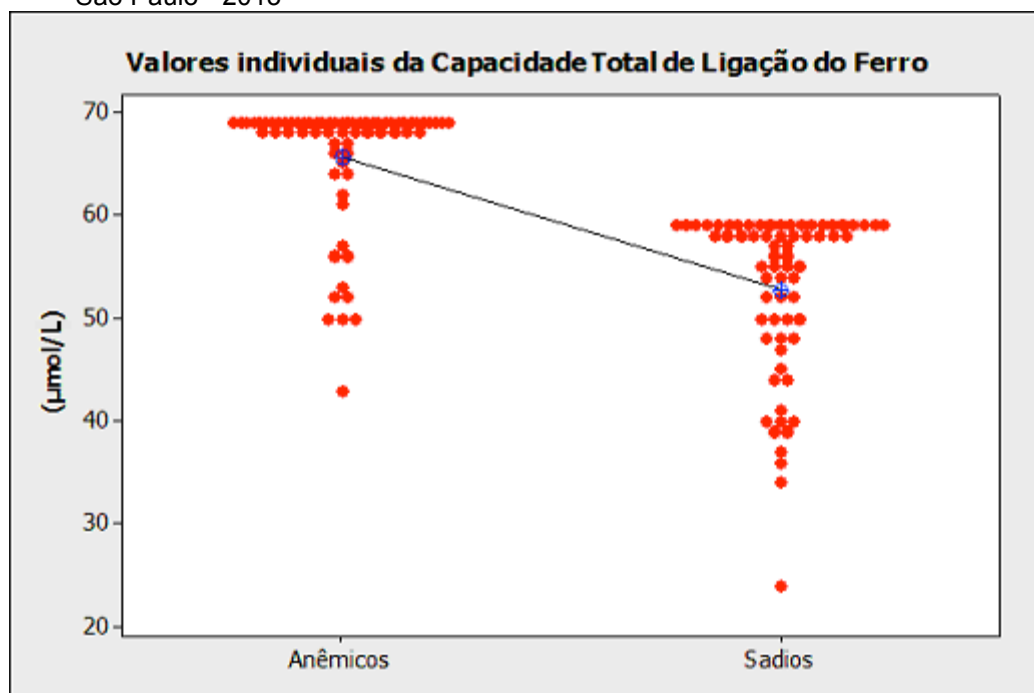
Fonte: (SANTOS, R.B., 2013).

Gráfico 5 - Distribuição dos valores individuais dos teores de ferro sérico de bezerros da raça Holandesa Preta e Branca, no primeiro mês de vida, agrupados segundo presença de anemia, criados em fazendas produtoras de leite no Estado de São Paulo - 2013



Fonte: (SANTOS, R.B., 2013).

Gráfico 6 - Distribuição dos valores individuais da Capacidade Total de Ligação do Ferro (CTLF) de bezerros da raça Holandesa Preta e Branca, no primeiro mês de vida, agrupados segundo presença de anemia, criados em fazendas produtoras de leite no Estado de São Paulo - 2013



Fonte: (SANTOS, R.B., 2013).

Com a finalidade de avaliar se a zinco protoporfirina pode ser utilizada como previsor dos quadros de anemia ferropriva em bezerros, foi realizada também o teste de correlação de Pearson entre a ZPP e as diferentes variáveis do hemograma e dos componentes bioquímicos dos 134 animais utilizados no experimento, definindo-se assim quais variáveis influenciam diretamente e de maneira significativa os valores de ZPP. Estes índices são apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Resultados de correlação (rs) e respectivo nível descritivo ("p") do teste de Pearson entre valores obtidos para as concentrações de zinco protoporfirina (ZPP) contra os valores do número de hemácias (He), do volume globular (VG), da taxa de hemoglobina (Hb), do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM), da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), do número de reticulócitos e de leucócitos, das concentrações de bilirrubinas total (BT), direta (BD) e indireta (BI), da taxa de ferro total sérico (FT), da capacidade total de ligação de ferro (CTLF) e da ureia sérica de 134 bezerros da raça Holandesa Preta e Branca, no primeiro mês de vida, criados em fazendas produtoras de leite no Estado de São Paulo - 2013

Correlação	rs	p
ZPP x He	- 0,44	< 0,001*
ZPP x VG	- 0,53	< 0,001*
ZPP x Hb	- 0,51	< 0,001*
ZPP x VCM	- 0,48	< 0,001*
ZPP x HCM	- 0,26	0,002*
ZPP x CHCM	0,18	0,032*
ZPP x Reticulócitos	0,04	0,598
ZPP x Leucócitos	0,17	0,045*
ZPP x BT	- 0,07	0,422
ZPP x BD	- 0,02	0,755
ZPP x BI	- 0,07	0,384
ZPP x FT	- 0,45	< 0,001*
ZPP x CTLF	0,51	< 0,001*
ZPP x Ureia	- 0,11	0,211

* p < 0,05 indica que há correlação.

Fonte: (SANTOS, R.B., 2013).

Os valores individuais obtidos para as concentrações da zinco protoporfirina, dos componentes do hemograma e reticulocitometria, e das análises bioquímicas realizadas nos 134 animais utilizados neste estudo encontram-se disponíveis nos apêndices A, B, C e D (67 animais anêmicos), e E, F, G e H (67 animais saudáveis), respectivamente.

5 DISCUSSÃO

5.1 PADRONIZAÇÃO DOS VALORES DA ZINCO PROTOPORFIRINA ERITROCITÁRIA EM BEZERROS CLINICAMENTE SADIOS

Em humanos e em algumas espécies animais a mensuração da ZPP eritrocitária permite a identificação da deficiência de ferro antes do desenvolvimento da anemia, pois quando há deficiência de ferro para eritropoiese, a síntese do grupamento heme é alterada e a ZPP é formada (HART; PIOMELLI, 1981; LABBÉ; DEWANJI; McLAUGHLIN, 1999; LABBÉ; VREMAN; STEVENSON, 1999). Isto ocorre porque tanto o ferro como o zinco interagem competindo como substrato da enzima ferroquelatase (LABBÉ; RETTMER, 1989). A utilização diagnóstica da determinação da zinco protoporfirina (ZPP) eritrocitária em seres humanos como um marcador precoce da eritropoiese deficiente de ferro nas anemias causadas por doenças renais tem sido feita, bem como em outras afecções que evoluem com quadros de anemia (BRAUN, 1999; LABBÉ; DEWANJI; McLAUGHLIN, 1999; RETTMER et al., 1999; MAFRA; COZZOLINO, 2000; BAKER, 2013; MAGGE et al., 2013), indicando a potencial possibilidade do uso desta determinação em medicina veterinária e em especial, no presente estudo, em relação a espécie bovina.

Inicialmente foram mensuradas as amostras de hemácias não lavadas, sendo que esses valores foram determinados após 3 horas da colheita de sangue dos animais. Nessa primeira mensuração, o valor da média da ZPP eritrocitária foi de 80,9 $\mu\text{mol ZPP/mol heme}$, com desvio padrão de 24,36 $\mu\text{mol ZPP/mol heme}$ e valores máximo e mínimo de 139 e 51 $\mu\text{mol ZPP/mol heme}$, respectivamente. Os teores de ZPP observados são maiores que os descritos em humanos, pois de acordo com Schifman e Finley (1981), os valores normais de ZPP para os homens estão no intervalo de 25 a 57 $\mu\text{mol ZPP/mol heme}$ e para as mulheres entre 29 e 50 $\mu\text{mol ZPP/mol heme}$. Para a espécie humana, Hastka et al. (1993) referem também que valores acima de 40 $\mu\text{mol ZPP/mol heme}$ são indicativos de distúrbios no metabolismo do ferro.

O valor da média da ZPP eritrocitária, após a lavagem de hemácias, determinada até 3 horas após colheita de sangue no grupo de bezerros clinicamente

sadios foi de 61,4 $\mu\text{mol ZPP/mol heme}$, com desvio padrão de 23,68 $\mu\text{mol ZPP/mol heme}$ e valores máximo e mínimo de 117 e 26 $\mu\text{mol ZPP/mol heme}$, respectivamente. Verifica-se que com a lavagem os valores encontrados foram menores que aqueles obtidos com a análise em hemácias não lavadas. Ademais as análises das amostras de suspensão de hemácias lavadas não apresentaram diferença significativa entre os valores da ZPP obtidos nos momentos de 3 e 12 horas p.c. com armazenamento sob refrigeração. O valor da média da ZPP eritrocitária, após a lavagem de hemácias, determinada até 12 horas após a colheita de sangue foi de 61,03 $\mu\text{mol ZPP/mol heme}$, com desvio padrão de 24,35 $\mu\text{mol ZPP/mol heme}$ tendo valores máximo e mínimo de 122 e 26 $\mu\text{mol ZPP/mol heme}$, respectivamente. Estes achados indicam a viabilidade de mensuração da ZPP nas amostras de sangue de bezerros com até 12 horas de armazenamento sob refrigeração a 4°C. O confronto destes resultados com outros obtidos em medicina veterinária é difícil, pois os dados sobre tal avaliação na literatura são escassos ou inexistentes, como já mencionado. Há uma pesquisa em cães saudáveis em que os valores obtidos foram de $56 \pm 2 \mu\text{mol/mol heme}$ (AMBROGI et al., 1996). Em outro estudo realizado com 91 gatos saudáveis, na Austrália, concluiu-se que a protoporfirina eritrocitária predominante em felinos é a ZPP, sendo que foi possível o diagnóstico de intoxicação por chumbo em três desses animais (HAWKE et al., 1992); não havendo, no entanto, citação da concentração exata da ZPP, pois esta foi calculada de forma indireta pela concentração de protoporfirina eritrocitária, utilizando-se a espectroscopia de fluorescência.

Em um estudo feito por Hatherly et al. (2009), com 30 caprinos adultos clinicamente sadios, obtiveram valores da média e desvio-padrão de $61,566 \pm 8,885 \mu\text{mol ZPP/mol heme}$ na mensuração da quantidade de ZPP feita 3 horas após a colheita de sangue e de $59,766 \pm 8,732 \mu\text{mol ZPP/mol heme}$ na mensuração feita após 12 horas da colheita. Bombardelli et al. (2010) realizaram uma pesquisa com 30 ovinos adultos, clinicamente saudáveis, em que obtiveram valores da média e desvio-padrão da quantidade de ZPP de $73,76 \pm 16,52 \mu\text{mol ZPP/mol heme}$ na mensuração feita em sangue total, 3 horas após a colheita; de $59,36 \pm 16,02 \mu\text{mol ZPP/mol heme}$ na mensuração feita em hemácias lavadas, 3 horas após a colheita e de $59,70 \pm 16,18 \mu\text{mol ZPP/mol heme}$ na mensuração feita em hemácias lavadas, 12 horas após a colheita do sangue. Como observado, no trabalho realizado com

caprinos, executado por Hatherly et al. (2009), não foi apresentada a etapa de lavagem das hemácias, podendo-se verificar que a conservação sob refrigeração foi eficiente até 12 horas p.c., no entanto a diferença entre a mensuração da quantidade de ZPP em hemácias lavadas não pode ser constatada com os resultados obtidos nesse trabalho realizado com caprinos e naquele feito por Bombardelli et al. (2010), em ovinos, o comportamento de conservação e queda dos valores com a lavagem das hemácias foi semelhante ao dos bezerros desta pesquisa. Observou-se ainda que o valor das médias das amostras de hemácias lavadas mensuradas nos momentos de 3 e 12 horas após a colheita do sangue não apresentaram diferença significativa, o que também foi constatado nos resultados apresentados no presente trabalho. O armazenamento das amostras de hemácias sob refrigeração a 4°C foi o que permitiu que os resultados encontrados nas mensurações das suspensões de hemácias lavadas nos dois momentos (3 e 12 horas após a colheita de sangue) fossem semelhantes.

Os valores observados nos bezerros clinicamente sadios, obtidos no presente estudo, são maiores que os descritos para os humanos, confirmando a necessidade de se estabelecer valores de referência fisiológicos específicos para cada espécie animal, possibilitando a utilização desta variável na avaliação dos processos anêmicos em que a deficiência de ferro seja um fator importante, uma vez que a mensuração da ferritina não está disponível em todas espécies animais como avaliação de rotina, por se tratar de um método de radioimunensaio do tipo ELISA espécie-específico.

Assim, a mensuração da ZPP pode ser introduzida como uma avaliação de rotina, pois o hematofluorômetro proporciona resultados confiáveis, em geral obtidos de forma rápida e não onerosa, requerendo uma amostra mínima de sangue venoso para sua realização (SCHIFMAN; FINLEY, 1981; AMBROGI et al., 1996; BRAUN, 1999; LABBÉ; VREMAN; STEVENSON, 1999).

Os resultados das mensurações em triplicata de uma mesma amostra de sangue colhida com EDTA comprovou que a técnica utilizada e a conservação foram adequadas e confiáveis para a espécie estudada, sendo evidenciadas pela estabilidade com pequenas oscilações dos valores obtidos nos diferentes tempos de conservação. No entanto, é importante ressaltar a possibilidade da zinco protoporfirina mensurada ser alterada quando medida em animais com concomitância de valores aumentados de bilirrubina sérica ou de outras substâncias

como a uréia, ou em casos de uso de vitaminas do complexo B, que podem gerar valores falsamente elevados da ZPP como destacado por outros autores (LABBÉ, 1992; LOURO; TUTOR, 1994). A lavagem das hemácias é recomendada, pois elimina possíveis substâncias interferentes e a conservação sob refrigeração a 4°C permite realizar-se a avaliação até 12 horas p.c., fatos confirmados em ovelhas (BOMBARDELLI et al., 2010) e em caprinos (HATHERLY et al., 2009) para a conservação.

Há entretanto, a necessidade de realização de futuras investigações, também considerando outras possíveis influências fisiológicas como a evolução etária, sexo, as raças e outras condições patológicas causadoras da deficiência de ferro.

5.2 AVALIAÇÃO DA ZINCO PROTOPORFIRINA ERITROCITÁRIA COMO PREVISORA DA OCORRÊNCIA DE ANEMIA FERROPRIVA EM BEZERROS COM ATÉ UM MÊS DE VIDA

Como já referido anteriormente, a utilização diagnóstica da determinação da zinco protoporfirina (ZPP) eritrocitária como um marcador precoce da eritropoiese deficiente de ferro tem sido comprovada nas anemias causadas por doenças renais em seres humanos (BRAUN, 1999; MAFRA; COZZOLINO, 2000), da mesma forma como também tem sido utilizada em pacientes com anemia decorrente de outras doenças crônicas (HASTKA et al., 1993; HARTHOORN-LASTHUIZEN; VAN'T SANT; LINDEMANS, 2000; SARAVANA; RAI, 2007).

Estudos também apontam que a ZPP tem se mostrado uma ótima previsor da anemia ferropriva em crianças recém nascidas, especialmente as prematuras (RETTMER et al., 1999; MILLER; McPHERSON; JUUL, 2006; BAUMANN-BLACKMORE et al., 2008; BAKER, 2013; MAGGE et al., 2013), e que a mesma também pode ser utilizada como indicadora dos teores séricos de ferro em crianças (ZIMMERMANN et al., 2005; YU, 2011). Em 2001, Winzerling e Kling mensuraram as concentrações de ZPP em prematuros no momento da alta hospitalar, e as correlacionaram diretamente com a distribuição de tamanho das células vermelhas do sangue (Red Cell Distribution Width - RDW) e com o número de reticulócitos, afirmando que os valores de ZPP podem representar uma medida simples da

eritropoiese deficiente de ferro nestes prematuros.

Outro estudo realizado com crianças que nasceram prematuras e que estavam internadas na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) Neonatal comprova que as concentrações de ZPP são inversamente proporcionais ao tempo de gestação, e também que as mesmas são maiores em indivíduos neonatos que em adultos, além da observação de que a mensuração da ZPP seria clinicamente mais útil quando utilizada em conjunto com a contagem de reticulócitos e o Volume Globular (JUUL et al., 2003). Desta forma, sabe-se que a crescente utilização desta mensuração tende a torná-la uma prática na rotina da clínica neonatal humana (MYERS; WALKER; DAVIES, 2002; KLING, 2006), o que nos remete à mesma tentativa nas demais espécies, em especial, em neonatos bovinos.

Quando realizou-se a análise de variância dos valores de ZPP entre os dois grupos, anêmicos e sadios, encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa, sendo que as médias apresentadas foram de 92,07 e 68,40, respectivamente. O achado de valores de maior magnitude nos animais anêmicos está em conformidade com o que é descrito na literatura (HARTHORN-LASTHUIZEN; VAN'T SANT; LINDEMANS, 2000; WINZERLING; KLING, 2001; MYERS; WALKER; DAVIES, 2002; JUUL et al., 2003; MILLER; McPHERSON; JUUL, 2006; BAKER, 2013; MAGGE et al., 2013), uma vez que os indivíduos acometidos pelo processo anêmico ferroprivo tendem a apresentar menores teores de ferro sérico e, portanto, permitindo uma maior ligação do zinco à fração não proteica heme.

De modo similar, todas as determinações dos componentes do eritrograma quando analisadas entre os grupos denotaram diferenças significativas, sendo que os animais sadios (grupo controle) apresentaram, em geral, os maiores valores (fato este esperado em função da diminuição do *éritron* nos animais anêmicos). A única exceção que fugiu à expectativa foi aquela do comportamento do CHCM, pois os animais anêmicos apresentaram valores médios de 32,25% contra 30,23% nos sadios. No entanto, ambos os grupos apresentaram valores de todos componentes do eritrograma em conformidade com aqueles descritos na literatura, tanto para animais sadios (BIONDO et al., 1998; JAIN, 2000; MOHRI; SHARIFI; EIDI, 2007; BENESI et al., 2012b) quanto para anêmicos (TENNANT; HARROLD; REINAGUERRA, 1975; SANTOS et al., 2002).

A avaliação do número de reticulócitos não apresentou diferença significativa

quando comparados os grupos de animais anêmicos e sadios, sendo que seus valores, tanto relativos quanto absolutos, são concordes com os valores de referência para a espécie dentro da faixa etária em questão, conforme descritos por Benesi et al. na raça Holandesa (2012b) e Biondo et al. na raça Nelore (1998). São no entanto divergentes daqueles constatados por Ayres (1994), em bovinos da raça Nelore com idade inferior a 30 dias de vida que não apresentaram reticulócitos. Sabe-se que a reticulocitose seria esperada em quadros anêmicos regenerativos, uma vez que tais células servem como sinalizadoras da atividade de produção eritropoiética e eritroregeneração. Entretanto tal situação não acontece nos quadros de anemia ferropriva, pois há a deficiência da disponibilidade deste mineral e, conseqüentemente, a diminuição da eritropoiese, conforme observado neste trabalho.

O número absoluto de leucócitos de ambos os grupos também se encontram dentro do referido pela literatura (TENNANT; HARROLD; REINA-GUERRA, 1974; BIONDO et al., 1998; JAIN, 2000; MOHRI; SHARIFI; EIDI, 2007; BENESI et al., 2012a) assim como os componentes do leucograma. A única exceção se faz quanto ao número de linfócitos atípicos encontrados (média de 34,40 nos animais anêmicos e 94,90 nos sadios) que é inferior ao descrito por Benesi et al. (2012a), que relata valores mínimos de 91,90 e máximos de 388,50. Registra-se como a única diferença significativa entre os grupos o resultado do número de linfócitos, com média absoluta de 4335/ μ l para os animais anêmicos e 3577/ μ l para os sadios, ambos, no entanto dentro do intervalo dos valores de referência para a espécie e mesma faixa etária, não caracterizando linfocitose.

A análise bioquímica demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos com relação às bilirrubinas total, direta e indireta, o que vem ao encontro do esperado uma vez que as anemias investigadas não eram decorrentes de um processo de hemólise e sim de eritropoiese ineficiente em função da deficiência da disponibilização de ferro. Seus valores, porém estão em acordo com os descritos na literatura por Souza (1997); Vieira et al. (2001) e Benesi et al. (2003), e um pouco maiores que os descritos por Souza et al. (2004) para a raça Holandesa. Conforme explicitado na Tabela 6, as concentrações de bilirrubinas não interferiram nos resultados da mensuração da ZPP, pois além de baixas correlações (rs) ainda apresentaram valores de "p" muito superiores a 5%, caracterizando ausência de significância.

Não houve também diferença entre os grupos quanto às concentrações de Ureia sérica, sendo que ambos se mostraram com valores em conformidade com o descrito na literatura por Steinhardt et al. (1993); Vieira et al. (2001); Coelho (2002) e Feitosa et al. (2009). De forma semelhante, não houve influência da ureia na mensuração da ZPP, conforme demonstra a ausência de correlação destacada na tabela 6 ($r_s = -0,11$; $p = 0,211$).

Como esperado, foi encontrada diferença significativa entre os grupos com relação aos valores dos teores de ferro total e da capacidade total de ligação de ferro. Os animais anêmicos apresentaram médias de teores de ferro total sérico e capacidade total de ligação de ferro respectivamente de 9,51 e 65,67 $\mu\text{mol/L}$, enquanto bezerros do grupo controle valores médios de 16,71 e 52,76 $\mu\text{mol/L}$. O comportamento oposto do FT e CTLF caracterizando que quanto menores foram os teores de ferro, maiores foram os valores da capacidade total de ligação de ferro, são comportamentos conhecidos e característicos das anemias ferroprivas. Os valores observados para os animais sadios estão de acordo com aqueles descritos na literatura (MOHRI; SHARIFI; EIDI, 2007; KANEKO; HARVEY, BRUSS, 2008; ROCHA et al., 2009; RENGIFO et al., 2010).

A fim de se avaliar se a zinco protoporfirina pode ser uma boa previsora para a anemia ferropriva em bezerros neonatos, correlacionou-se os valores encontrados dos teores de ferro sérico com as concentrações de ZPP, conforme mostrado na tabela 6. Os valores da correlação e de "p" encontrados para o ferro total foram de -0,45 e $< 0,001$, respectivamente, indicando uma boa correlação negativa, ou seja, que quanto menores os teores de ferro total, maiores serão as concentrações de ZPP, além da alta significância. Quando correlacionada a capacidade total de ligação do ferro com a ZPP encontramos boa correlação positiva ($r_s = 0,51$; $p < 0,001$), comprovando que a hipótese de que a ZPP atua como boa previsora dos quadros de anemia ferropriva é verdadeira também para bezerros neonatos, fato concordante com os achados dos estudos realizados em medicina humana (HARTHOORN-LASTHUIZEN; LINDEMANS; LANGENHUIJSEN, 1998; RETTMER et al., 1999; MYERS; WALKER; DAVIES, 2002; KLING, 2006). Conforme referido na literatura, os quadros de anemia microcítica hipocrômica, comuns na eritropoiese deficiente em ferro, apresentam boa correlação dos valores do hematócrito e do CHCM com a zinco protoporfirina (WORWOOD, 1994; BRAUN, 1999; GARRET; JUUL et al., 2003). As correlações negativas da ZPP com o VG ($r_s = -0,53$; $p <$

0,001), com o número de hemácias ($r_s = - 0,44$; $p < 0,001$) e com as concentrações de hemoglobina ($r_s = - 0,51$; $p < 0,001$) também foram observadas no presente estudo, porém não houve a constatação do mesmo comportamento no que diz respeito à correlação da ZPP com o CHCM ($r_s = 0,18$; $p = 0,03$), a qual se mostrou positiva, apesar da significância (Tabela 6).

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- a) as amostras de sangue colhidas para a mensuração da ZPP podem ser armazenadas, sob refrigeração a 4°C, por até 12 horas após a colheita, sem alterações significativas dos valores da ZPP eritrocitária;
- b) deve-se proceder a lavagem das hemácias antes da mensuração dos valores da ZPP eritrocitária devido à presença de substâncias interferentes no plasma do animal;
- c) a hematofluorometria é um método rápido e não oneroso, podendo ser recomendado como método rotineiro;
- d) é possível a utilização da ZPP como previsor dos quadros de anemia ferropriva em bezerros neonatos com até um mês de vida;
- e) as concentrações de bilirrubinas e da ureia sérica apresentaram-se no intervalo fisiológico de variação, não interferindo na mensuração da ZPP nos eritrócitos dos bezerros com anemia do presente estudo.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da biologia celular**: uma introdução à biologia molecular da célula. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, 864 p.
- AMBROGI, C.; CARDINI, G.; BALDI, S. B.; BUZZIGOLI, G.; QUINONESGALVAN, A.; FERRANNINI, E. Delta-aminolevulinic acid dehydratase and zinc protoporphyrin in very low lead exposure pets: a community study. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 38, n. 5, p. 336-339, Oct.1996.
- ANDREWS, G. A.; SMITH, J. E. Iron metabolism. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 2000. p. 129-134.
- AYRES, M. C. C. **Eritrograma de zebuínos (*Bos indicus*, Linnaeus, 1758) da raça Nelore, criados no Estado de São Paulo - Influência dos fatores etários, sexuais e do tipo racial**. 1994. 119 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.
- BAART, A. M.; DE KORT, W. L. A. M.; MOONS, K. G.M.; ATSMAN, F.; VERGOUWE, Y. Zinc protoporphyrin levels have added value in the prediction of low hemoglobin deferral in whole blood donors. **Transfusion**, Baltimore, v. 53, p.1661-1669, Aug. 2013.
- BAKER, R. D. Zinc Protoporphyrin to Prevent Iron Deficiency. **JAMA Pediatrics**, Seattle, v. 167, n. 4, p. 393-394, Apr. 2013.
- BAUMANN-BLACKMORE, N. L.; GOETZ, E.; BLOHOWIAK, S. E.; ZAKA, O.; KLING, P. J. Cord blood zinc protoporphyrin/heme ratio in minority neonates at risk for iron deficiency. **Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 153, p. 133-136, July. 2008.
- BENESI, F. J. Diagnóstico e terapia das anemias em caprinos. In: D'ANGELINO, J. L. **Manejo, patologia e clínica de caprinos**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1985. p. 171-192.
- BENESI, F. J.; PEREIRA, M. C.; CARDOSO DE SÁ, C. S.; HOWARD, D. L.; TEIXEIRA, C. M. C.; LARSSON, C. E. Cat flea infestation in a newborn Jersey calf in Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 7, n. 2, p. 157-160, ago.1998.

BENESI, F. J.; HOWARD, D. L.; CARDOSO DE SÁ, C. S.; BIRGEL JR., E. H. Relato de um caso de transmissão transplacentária de anaplasmosose bovina. Observações clínico-laboratoriais. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 6, n.30, p. 175-176, 1999.

BENESI, F. J.; LEAL, M. L. R.; LISBOA, J. A. N.; COELHO, C. S.; MIRANDOLA, R. M. S. Parâmetros bioquímicos para avaliação da função hepática em bezerras sadias, da raça Holandesa, no primeiro mês de vida. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 311-317, abr. 2003.

BENESI, F. J.; LISBOA, J. A. N.; TEIXEIRA, C. M. C.; LEAL, M. L. R.; WACHHOLZ, L.; MIRANDOLA, R. M. S. Ocorrência de anemia em bezerros holandeses no primeiro mês de vida. Levantamento preliminar.. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 27.; CONGRESSO PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 5.; CONFERÊNCIA ANUAL DA SPMV, 55.; EXPOVET, 6., 2000, Águas de Lindóia, **Anais...** 2000. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 2000, p. 26-27.

BENESI, F. J.; TEIXEIRA, C. M. C.; LEAL, M. L. R.; LISBOA, J. A. N.; MIRANDOLA, R. M. S.; SHECAIRA, C. L.; GOMES, V. Leukograms of healthy Holstein calves within the first month of life. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 32, n. 4, p. 352-356, abr. 2012a.

BENESI, F. J.; TEIXEIRA, C. M. C.; LISBOA, J. A. N.; LEAL, M. L. R.; BIRGEL JÚNIOR, E. H.; BOHLAND, E.; MIRANDOLA, R. M. S. Eritrograma de bezerras sadias, da raça Holandesa, no primeiro mês de vida. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 32, n. 4, p. 357-360, abr. 2012b.

BENNETT, D. G. Anemia and Hypoproteinemia. **Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practice**, v. 5, n. 3, p. 511-524, 1983. Trabalho apresentado a Symposium on Sheep and Goat Medicine.

BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P.; GOTLIES, S. L. D. **Bioestatística**. São Paulo: Pedagógica e Universitária, 1981. 350 p.

BÍBLIA Sagrada: nova versão internacional. São Paulo: Sociedade Bíblica Internacional, 2001. Romanos, cap. 12, versículo 2.

BIONDO, A. W.; LOPES, S. T. A.; KOHAYAGAWA, A.; TAKAHIRA, R. K.; ALENCAR, N. X. Hemograma de bovinos (*Bos indicus*) sadios da raça Nelore no primeiro mês de vida, criados no Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 2, p. 251-256, 1998.

BIRGEL, E. H. **Hämatologische Untersuchungen bei Kälber der Rasse "Deutsches Schwartzbuntes Rind" in den ersten 14 Lebenstagen.** 1972. 89 f. Tese (Doutorado em Ginecologia e Obstetrícia) - Tierärztliche Hochschule Hanover, Hanover, 1972.

BIRGEL, E. H. Hematologia Clínica Veterinária In: BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J. **Patologia Clínica Veterinária.** 2. ed. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 2-62.

BIRGEL, E. H. **Anemia dos pequenos ruminantes.** Porto Alegre: ABEAS – Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior, 2000, v. 1, 46 p.

BLUMBERG, W. E.; EISINGER, J.; LAMOLA, A. A.; ZUCKERMAN, D. N. The hematofluorometer. **Clinical Chemistry**, New York, v. 23, n. 2, p. 270–274, Feb.1977.

BOMBARDELLI, J. A.; SILVA, M. B.; KOGIKA, M. M.; BENESI, F. J. Estudo sobre a aplicação da avaliação da zinco protoporfirina (ZPP) eritrocitária em ovinos clinicamente sadios. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 18., 2010, Piracicaba, **Anais...** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2010.

BRAUN, J.; HAMMERSCHMIDT, M.; SCHREIBER, M.; HEIDLER, R.; HÖRL, W. H. Is zinc protoporphyrin an indicator of iron-deficient erythropoiesis in maintenance haemodialysis patients? **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 11, n. 3, p. 492 – 497. Mar.1996.

BRAUN, J.; LINDNER, K.; SCHEREIBER, M.; HEIDLER, R.; HÖRL, W. H. Percentage of hypochromic red blood cells as predictor of erythropoietic and iron response after i.v. iron supplementation in maintenance haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 1173-1181. June 1997.

BRAUN, J. *Erythrocyte zinc protoporphyrin.* **Kidney International Supplements**, New York, v. 55, p. S57-S60, Mar. 1999.

BURHMANN, E.; MENTZER, W. C.; LUBIN, B. H. The influence of plasma bilirubin on zinc protoporphyrin measurement by a hematofluorometer. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v. 91, n. 4, p. 710–716, Apr. 1978.

CARVALHO, F. M.; NETO, A. M. S.; PERES, M. F. .T; GONÇALVES, H. R.; GUIMARÃES, G. C.; AMORIM, C. J. B.; SILVA JR., J. A. S.; TAVARES. T. M. Intoxicação pelo chumbo: Zincoprotoporfirina no sangue de crianças de Santo Amaro da Purificação e de Salvador, BA. **Jornal de pediatria**, Rio de Janeiro, v. 72, n. 5, p. 295-298, set-out. 1996.

CARVALHO, I. M. de; SILVA, N. M. da. Alterações hematológicas em bezerros experimentalmente infectados com *Strongyloides papillosus*. (Wedl., 185 g). Ranson, 1911. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Itaguaí, v. 12, n. 1-2, p. 21-28, 1989.

COELHO, C. S. **Avaliação da função renal, do metabolismo ósseo e do equilíbrio hidroeletrólítico em bezerras sadias, da raça Holandesa, no primeiro mês de vida. Influência do fator etário.** 2002, 125 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

COVE-SMITH, J. R. Trying to optimize iron availability in dialysis patients receiving erythropoietin. In: CAMERON, J. S. **Moving in the Second Decade of Clinical Experience in CRF.** Sevilla: Oxford University Press, 1995, p. 81-82.

DAS, S.; PHILIP, K. J. Evaluation of iron status: Zinc protoporphyrin vis-a-vis bone marrow iron stores. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, Mumbai, v. 51, n. 1 p. 105-107, Jan. 2008.

DRYDEN, M. W.; BROCE, A. B.; MOORE, W. E. Severe flea infestation in dairy calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 203, n. 10, p. 1448-1452, Nov. 1993.

FEITOSA, F. L. F.; PEIRÓ, J. R.; MENDES, L. C. N.; CADIOLI, F. A.; CAMARGO, D. G.; YANAKA, R.; BOVINO, F.; PERRI, S. H. V. Determinação do perfil bioquímico renal sérico de bezerros Holandeses e mestiços, na região de Araçatuba/SP. **Ciência Animal Brasileira**, p. 255-259, 2009. Suplemento 1. Trabalho apresentado ao 8. Congresso Brasileiro de Buiatria, Belo Horizonte, 2009.

GARRETT, S.; WORWOOD, M. Zinc protoporphyrin and iron-deficient erythropoiesis. **Acta Haematologica**, Basel, v. 91, n. 1, p. 21-25, Jan. 1994.

GEORGE, J. W.; DUNCAN, J. R. Erythrocyte protoporphyrin in experimental chronic lead poisoning in calves. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 42, n.9, p. 1630-1637. Sept. 1981.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep feces. **Journal of the Council for Scientific Industrial Research**, Melbourne, v. 12, n.1, p. 50-52, 1939.

HART, D.; PIOMELLI, S. Simultaneous quantitation of zinc protoporphyrin and free protoporphyrin in erythrocytes by acetone extraction. **Clinical Chemistry**, New York, v. 27, n. 2, p. 220-222, Feb.1981.

HARTHOORN-LASTHUIZEN, E. J.; LINDEMANS, J.; LANGENHUIJSEN, M. Zinc protoporphyrin as screening test in female blood donors, **Clinical Chemistry**, New York, v. 44, n. 4, p. 800-804, Apr. 1998.

HARTHOORN-LASTHUIZEN, E. J.; VAN'T SANT, P.; LINDEMANS, J.; LANGENHUIJSEN, M. Serum Transferrin Receptor and Erythrocyte Zinc Protoporphyrin in Patients with Anemia, **Clinical Chemistry**, New York, v. 46, n. 5, p. 719-722, May, 2000.

HASTKA, J.; LASSERE, J. J.; SCHWARZBECK, A.; STRAUCH, M.; HEHLMANN, R. Zinc protoporphyrin in anemia of chronic disorders. **Blood**, Washington, v. 81, n. 5, p. 1200-1204, Mar. 1993.

HATHERLY, P. P.; BORGES, M. S.; BOMBARDELLI, J. A.; KOGIKA, M. M.; BENESI, F. J.; Estudo sobre a aplicação da avaliação da zinco protoporfirina (ZPP) eritrocitária em caprinos clinicamente sadios. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 17., 2009, Pirassununga, **Anais...** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2009.

HAWKE, C. G.; MADDISON, J. E.; POULOS, V.; WATSON, A. D. J. Erythrocyte protoporphyrins concentrations in clinically normal cats and cats with lead toxicity. **Research in Veterinary Science**, Philadelphia, v. 53, n. 2, p.260-263, Sept. 1992.

JAIN, N. C. Cattle: Normal hematology with comments on response to disease. In: JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 4. ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 1986, p. 187-207.

JAIN N.C. Normal hematology of cattle, sheep and goats. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 2000. p.1075-1084.

JENDRASSIK, L.; GROF, P. Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubins. **Biochemische Zeitschrift**, v. 297, n. 1-2, p. 81-89, 1938.

JUUL, S. E.; ZERZAN, J. C.; STRANDJORD, T. P.; WOODRUM, D. E. Zinc Protoporphyrin/Heme as an indicator of iron status in NICU Patients. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 142, p. 273-278, Mar. 2003.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic Animals**, 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008, 916 p.

KANEKO, J. J.; MILLS, R. Hematological and blood chemical observations in neonatal normal and porphyric calves in early life. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 60, n. 1, p. 52-60, Jan. 1970

OLVER, C. S.; ANDREWS, G. A.; SMITH, J. E.; KANEKO, J. J. Erythrocyte Structure And Function. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's veterinary hematology**, 6. ed., Iowa: Blackwell, 2010. p. 123-129.

KLING, P. J. The zinc protoporphyrin/heme ratio in premature infants: has it found its place? **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 148, n. 1, p. 8-10, Jan. 2006.

KLOBUCARIC, A.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H. Ocorrência de anaplasmosse em bezerro recém nascido. In: SEMANA DE VETERINÁRIA, 4., 1986, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Universidade de São Paulo, 1986, p. 12.

KOWALCZYK, D. F.; NAYLOR, J. M.; GUNSON, D. The value of zinc protoporphyrin in equine lead poisoning: a case report. **Veterinary and Human Toxicology**. Manhattan, v. 23, n. 1, p. 12-15, Feb. 1981.

LABBÉ, R.; RETTMER, R. L. Zinc protoporphyrin: a product of iron deficient erythropoiesis. **Seminars in Hematology**, New York, v. 26, n. 1, p. 40-46, Jan. 1989.

LABBÉ, R. F.; FINCH, C. A. Erythrocyte protoporphyrin: applications in the diagnosis of iron deficiency. In: COOK, J. D. **Methods in hematology**. New York: Churchill Livingstone, 1981, p. 44-58.

LABBE, R. F. The clinical utility of zinc protoporphyrin. **Clinical Chemistry**, New York, v. 38, n.11, p. 2167-2168, Nov. 1992.

LABBÉ, R. F.; DEWANJI, A. A.; McLAUGHLIN, K. Observations on the Zinc protoporphyrin/heme ratio in whole blood. **Clinical Chemistry**, New York, v. 45, n.1, p. 146-148, Jan. 1999. (a)

LABBÉ, R. F.; VREMAN, H. J.; STEVENSON, D. K. Zinc protoporphyrin: a metabolite with a mission. **Clinical Chemistry**, New York, v. 45, n. 12, p. 2060-2072, Dec. 1999. (b)

LAMOLA, A. A.; EISINGER, J.; BLUMBERG, W. E. Bilirubin sensitivity of zinc protoporphyrin hematofluorometers. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v. 93, n. 2, p. 345-348, 1979.

LAMOLA, A. A.; EISINGER, J.; BLUMBERG, W.E. Erythrocyte protoporphyrin/heme ratio by hematofluorometry. **Clinical Chemistry**, New York, v. 26, n. 5, p. 677-678, Apr. 1980.

LOURO, M. O.; TUTOR, J. C. Hematofluorometric determination of erythrocyte zinc protoporphyrin: oxygenation and derivatization of hemoglobin compared. **Clinical Chemistry**, New York, v. 40, n. 3, p. 369-372, Mar. 1994.

LUTHER, D. G.; COX, H. U.; NELSON, W. O. Screening for neonatal isohemolytic anaemia in calves. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 46, n. 5, p. 1078-1079, May, 1985.

MAGGE, H.; SPRINZ, P.; ADAMS, W. G.; DRAINONI, M-L.; MEYERS, A. Zinc protoporphyrin and iron deficiency screening: trends and therapeutic response in an urban pediatric center. **JAMA Pediatrics**, Seattle, v. 167, n. 4, p. 361-367, Apr. 2013.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. Zinco protoporfirina como parâmetro de deficiência de ferro na insuficiência renal crônica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 152-156, 2000.

MAFRA, D. **Anemia na insuficiência renal crônica e suas implicações na distribuição de zinco corporal**. 2001. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MARTIN, C. J.; WERNTZ III, C. L.; DUCATMAN, A. M. The interpretation of zinc protoporphyrin changes in lead intoxication: a case report and review of the literature. **Occupational Medicine**, London, v. 54, n. 8, p. 587-591, Dec. 2004.

McGILLIVRAY, S. R.; SEAROY, G. P.; HIRSCH, V. M. Serum iron, total iron binding capacity, plasma copper and hemoglobin types in anemic and poikilocytic calves. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Ottawa, v. 49, n. 3, p. 286-290, July, 1985.

MEHENNAOUI, S.; CHARLES, E.; JOSEPH-ENRIQUEZ, B. CLAUW, M.; MILHAUD, G. E. Indicators of lead, zinc and cadmium exposure in cattle: II. Controlled feeding and recovery. **Veterinary and Human Toxicology**. Manhattan, v. 30, n. 6, p. 550-555, Dec. 1988.

MILLER, S. M.; McPHERSON, R. J.; JUUL, S. E. Iron sulfate supplementation decreases zinc protoporphyrin to heme ratio in premature infants. **Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 148, n. 1, p. 44-48, Jan. 2006.

MILLER, S. M. Iron supplementation in premature infants using the zinc protoporphyrin to heme ratio: short- and long-term outcomes. **Journal of Perinatology**, Philadelphia, v. 33, n. 9, p. 712-716, Sept. 2013.

MINITAB[®]. Versão 16, para Windows[®], 2013.

MOHRI, M.; SHARIFI, K.; EIDI, S. Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: Age related changes and comparison with blood composition in adults. **Research in Veterinary Science**, London, v. 83, n. 1, p. 30–39, Aug. 2007.

MOLIN, F. D.; PAOLIELLO, M. M. B.; CAPITAN, E. M. A zincoprotoporfirina como indicador biológico na exposição ao chumbo: uma revisão. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 71-80, 2006.

MYERS, B.; WALKER, A.; DAVIES, J. M. The utility of the zinc-protoporphyrin assay as an initial screen for iron-deficient erythropoiesis. **Hematology Journal**, London, v. 3, n. 2, p. 116-117, 2002.

PASZKOWSKA, M.; JEZYŃSKA, A.; KRÓL, M.; ROKICKA-PIOTROWICZ, M.; KURATOWSKA, Z. Zinc protoporphyrin (ZPP) in diagnosis of anemia. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, Warszawa, v. 98, n. 12, p. 520-526, Dec. 1997.

POLLETO, K. **Principais indicações para o exame de medula óssea no Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

PROSSER, C. S.; KOGIKA, M. M.; WAKI, M. F.; DANIEL, A. G. T.; SIMÕES, D. M. N.; ALVES, A.; SILVA, M. B. Erythrocyte zinc protoporphyrin evaluation in cats with chronic renal disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23. n. 3, p. 762-763, 2009. Trabalho apresentado ao Forum 2009 of American College of veterinary Internal Medicine, Montreal, 2009.

REECE, W. O. Acid-Base balance and selected hematologic, electrolyte and blood Chemical variables in calves. Milk-Fed vs conventionally fed. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 41, n.1, p. 109-113, Jan. 1980.

RENGIFO, S. A.; SILVA, R. A.; BOTTEON, R. C. C. M.; BOTTEON, P. T. L. Hemograma e bioquímica sérica auxiliar em bezerros mestiços neonatos e ocorrência de enfermidades. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.62, n.4, p.993-997, ago. 2010.

RETTMER, R. L.; CARLSON, T. H.; ORIGENES JR, M. L.; JACK, R. M.; LABBÉ, R. F. Zinc Protoporphyrin/Heme Ratio for Diagnosis of Preanemic Iron Deficiency. **Pediatrics**, Evanston, v. 104, n.3, e. 37, p. 1-5, Sept.1999.

ROCHA, T. G.; FRANCIOSI, C.; NOCITI, R. P.; JORGE, R. L. N.; FAGLIARI, J. J. Concentrações séricas de cálcio, fósforo, magnésio, ferro, sódio e potássio em bezerros mestiços Canchim-Nelore e da raça Holandesa do nascimento aos 30 dias de idade. **Ciência Animal Brasileira**, p. 214-219, 2009. Suplemento 1. Trabalho apresentado ao 8. Congresso Brasileiro de Buiatria, Belo Horizonte, 2009.

RONDÓ, P. H. C.; CARVALHO, M. F. H.; SOUZA, M. C.; MORAES, F. Lead, hemoglobin, zinc protoporphyrin and ferritin concentrations in children. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 1, fev. 2006.

SANTOS, R. B.; REIS, C. R. B.; LISBOA, J. A. N.; LEAL, M. L. R.; MIRANDOLA, R. M. S.; BENESI, F. J. Avaliação do eritrograma de bezerras anêmicas da raça Holandesa com até um mês de vida.. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 10., 2002, Piracicaba. **Anais...** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2002. (Distinção de Menção Honrosa)

SANTOS, R. B.; BENESI, F. J.; REIS, G. A.; BOMBARDELLI, J. A.; SHECAIRA, C. L.; SEINO, C. H. Standardization of method for assessing iron deficiency anemia in newborn calves, In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 27., 2012, Lisbon. **Anais...** Lisbon: Buiatrics, 2012.

SARAVANA, S.; RAI, A. Anemia of Chronic Disease in Patients with Rheumatoid Arthritis - Use of Zinc Protoporphyrin (ZPP) Levels. **Journal of Rheumatology**, Toronto, v. 34, n. 2, p. 446-447, Feb. 2007.

SCHIFMAN, R. B.; FINLEY, P. R. Measurement of near normal concentrations of erythrocyte protoporphyrin with the hematofluorometer: influence of plasma on "front-surface illumination" assay. **Clinical Chemistry**, New York, v. 27, n. 1, p. 153-156, Jan. 1981.

SOUZA, P. M. **Perfil bioquímico sérico de bovinos das raças Gir, Holandesa e Girolanda, criados no Estado de São Paulo - influência de fatores de variabilidade etários e sexuais**. 1997. 247 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

SOUZA, R. M.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; AYRES, M. C. C.; BIRGEL, E. H. Influência dos fatores raciais na função hepática de bovinos da raça Holandesa e Jersey. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41, n. 5, p. 306-312, maio, 2004.

STEINHARDT, M.; GOLLNAST, I.; LANGANKE, M.; BÜNGER, U.; KUTSCHRE, J. Biochemical blood values in newborn calves. Effects of some interior and exterior conditions. **Tierärztliche-Praxis**, Stuttgart, v. 21, n. 4, p. 295-301, 1993.

SWAAK A. Anemia of chronic disease in patients with rheumatoid arthritis: aspects of prevalence, outcome, diagnosis and the effect of treatment on disease activity. **Journal of Rheumatology**, Toronto, v. 33, n. 8, p. 1467-1468, Aug. 2006.

TENNANT, B.; HARROLD, D.; REINA-GUERRA, M. B. Haematology of the neonatal calf: Erythrocyte and leukocyte values of normal calves. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 64, n. 4, p. 516-532, Oct. 1974.

TENNANT, B.; HARROLD, D.; REINA-GUERRA, M. colaboradores. Hematology of the neonatal calf. III. Frequency of congenital iron deficiency anemia. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 65, n. 4, p. 543-556, Oct. 1975.

TVEDTEN, H.; WEISS, D. J. Classification and Laboratory Evaluation of Anemia. In: In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**, 5. ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 2000, p. 143-150.

VIEIRA, D.; MENDONÇA, C. L.; KOHAYAGAWA, A.; MADRUGA, C. R.; SCHENKI, M. A.; KESSLER, R. Avaliações da parasitemia, do hematócrito e dos níveis bioquímicos séricos, de bezerros Nelore (*Bos indicus*), inoculados com isolados de *Babesia bigemina* (smith & kilborne, 1893) das regiões Sul, Sudeste, Centro-oeste, Nordeste e Norte do Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 2, n. 2, p. 101-109, 2001.

WAKI, M. F.; PROSSER, C. S.; SILVA, M. B.; TEIXEIRA, B. M.; KOGIKA, M. M. Avaliação da zinco protoporfirina (ZPP) eritrocitária em gatos clinicamente normais. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 16., 2008, Piracicaba. **Anais...** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2008.

WIJBENGA, A.; VAN DER KOLK, F. R.; VISSER, I. J.; BAARS, A. J. Lead poisoning in cattle in Northern Netherlands. Follow-up study of 2 farms. **Tijdschrift Voor Diergeneeskunde**, Amsterdam, v. 117, n. 3, p. 78-81, Feb. 1992.

WINZERLING, J. J.; KLING, P. J. Iron-deficient erythropoiesis in premature infants measured by blood zinc protoporphyrin/heme. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 139, n. 1, p. 134-136, July 2001.

WONG, S. S.; QUTISHAT, A. S.; LANGE, J.; GORNET, T. G.; BUJA, L. M. Detection of iron-deficiency anemia in hospitalized patients by zinc protoporphyrin. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 244, n. 1, p. 91-101, Jan. 1996.

YU, K. H. Effectiveness of zinc protoporphyrin/heme ratio for screening iron deficiency in preschool-aged children. **Nutrition Research and Practice**, Seoul, v. 5, n. 1, p. 40-45, Feb. 2011.

ZIMMERMANN, M. B.; MOLINARI, L.; STAUBLI-ASOBAYIRE, F.; HESS, S. Y.; CHAOUKI, N.; ADOU, P.; HURRELL, R. F. Serum transferrin receptor and zinc protoporphyrin as indicators of iron status in African children. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 81, n. 3, p. 615-623, Mar. 2005.

APÊNDICE A - VALORES INDIVIDUAIS OBTIDOS PARA AS CONCENTRAÇÕES DE ZINCO PROTOPORFIRINA (ZPP) E OS COMPONENTES DO HEMOGRAMA: NÚMERO DE HEMÁCIAS (HE), TAXA DE HEMOGLOBINA (HB) E VOLUME GLOBULAR (VG), EM BEZERROS ANÊMICOS DA RAÇA HOLANDESA PRETA E BRANCA, NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA, CRIADOS EM FAZENDAS PRODUTORAS DE LEITE NO ESTADO DE SÃO PAULO - 2013

(continua)

Nº do animal	ZPP ($\mu\text{mol ZPP/mol heme}$)	Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hemoglobina (g/dL)	Volume Globular (%)
3	71	6,55	7,20	22
4	122	6,42	6,60	19
5	118	6,50	6,90	20
9	93	5,81	7,50	22
11	85	5,22	5,90	18
13	92	5,93	7,20	21
15	137	6,44	6,10	19
16	136	6,03	5,90	18
17	84	6,06	7,80	22
20	152	6,39	7,40	21
21	94	6,59	8,20	23
22	108	6,55	7,70	23
25	101	6,72	8,00	24
26	70	6,33	7,50	22
27	95	5,22	7,20	21
28	87	6,44	7,40	22
32	109	4,92	6,10	18
34	92	4,96	6,40	19
41	54	5,91	6,90	21
42	86	6,19	7,50	22
43	80	6,34	7,70	22
44	99	5,71	7,80	23
45	67	5,38	6,70	20
48	76	5,46	8,00	24
50	82	5,83	7,20	21
55	109	4,88	5,80	18
56	58	5,21	8,00	24
58	104	6,76	7,10	24
64	59	5,43	6,50	18
66	128	5,07	5,80	18
69	97	6,95	7,20	24
75	88	5,74	6,90	20
81	75	5,62	8,00	23
86	65	6,31	8,20	23
90	105	6,22	7,10	22
91	72	4,99	7,80	23
94	86	6,20	7,30	24
96	87	5,98	6,80	21

APÊNDICE A - VALORES INDIVIDUAIS OBTIDOS PARA AS CONCENTRAÇÕES DE ZINCO PROTOPORFIRINA (ZPP) E OS COMPONENTES DO HEMOGRAMA: NÚMERO DE HEMÁCIAS (HE), VOLUME GLOBULAR (VG), TAXA DE HEMOGLOBINA (HB), EM BEZERROS ANÊMICOS DA RAÇA HOLANDESA PRETA E BRANCA, NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA, CRIADOS EM FAZENDAS PRODUTORAS DE LEITE NO ESTADO DE SÃO PAULO - 2013

(conclusão)

Nº do animal	ZPP ($\mu\text{mol ZPP/mol heme}$)	Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hemoglobina (g/dL)	Volume Globular (%)
101	45	6,80	7,70	23
105	97	5,34	6,20	20
107	60	5,72	6,10	19
118	83	6,16	6,90	21
122	109	5,47	6,00	20
127	95	6,38	6,80	24
135	78	6,08	6,60	19
138	92	5,22	6,10	19
139	104	6,22	6,60	23
148	108	5,74	6,60	21
150	115	5,42	5,70	21
154	75	6,47	7,00	23
155	84	5,61	5,90	22
158	104	5,31	6,50	18
162	71	6,34	6,30	24
163	115	5,42	5,70	17
165	92	4,82	5,80	17
166	121	6,73	7,20	24
171	96	5,64	5,90	20
172	79	5,99	6,40	23
175	73	6,34	6,90	22
176	95	5,48	6,00	20
177	86	6,71	7,40	24
180	82	4,85	5,50	17
181	96	5,78	6,40	21
251	98	5,32	6,40	22
289	85	5,42	5,90	19
294	107	6,30	6,10	21
302	101	6,73	7,20	24

APÊNDICE B - VALORES INDIVIDUAIS OBTIDOS PARA OS ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO (VCM), HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA (HCM), CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA (CHCM), E RETICULOCITOMETRIA EM BEZERROS ANÊMICOS DA RAÇA HOLANDESA PRETA E BRANCA, NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA, CRIADOS EM FAZENDAS PRODUTORAS DE LEITE NO ESTADO DE SÃO PAULO - 2013

(continua)

Nº do animal	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Reticulócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
3	33,20	10,90	33,10	0,00
4	30,10	10,20	34,10	0,00
5	30,70	10,60	34,60	0,00
9	38,50	12,90	33,60	11,62
11	34,10	11,30	33,10	5,22
13	35,40	12,10	33,10	0,00
15	29,20	9,40	32,40	6,44
16	29,20	9,70	33,50	0,00
17	36,60	12,80	35,20	0,00
20	33,50	11,50	34,50	6,39
21	35,60	12,40	35,00	6,59
22	34,90	11,70	33,70	0,00
25	35,30	11,90	33,70	0,00
26	34,10	11,80	34,80	6,33
27	40,20	13,70	34,40	0,00
28	34,10	11,40	33,70	0,00
32	36,60	12,40	33,90	9,84
34	38,40	12,90	33,60	0,00
41	45,30	15,10	35,50	0,00
42	36,30	12,10	33,40	6,19
43	35,30	12,10	34,50	0,00
44	40,20	13,60	34,00	5,71
45	37,00	12,40	33,60	5,38
48	43,10	14,60	34,00	5,46
50	35,30	12,30	35,10	11,66
55	36,20	11,80	32,90	0,00
56	46,40	15,30	33,10	5,21
58	35,50	10,50	29,60	0,00
64	48,70	16,20	33,30	0,00
66	34,00	11,40	33,70	5,07
69	34,50	10,40	30,00	6,95
75	34,90	12,00	34,50	5,74
81	41,60	14,20	34,30	11,24
86	36,70	12,90	35,40	0,00
90	49,50	16,30	33,10	0,00
91	47,00	15,60	33,30	4,99
94	38,00	11,80	30,80	6,20
96	35,10	11,40	32,40	0,00
101	36,80	11,40	31,00	0,00

APÊNDICE B - VALORES INDIVIDUAIS OBTIDOS PARA OS ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO (VCM), HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA (HCM), CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA (CHCM), E RETICULOCITOMETRIA EM BEZERROS ANÊMICOS DA RAÇA HOLANDESA PRETA E BRANCA, NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA, CRIADOS EM FAZENDAS PRODUTORAS DE LEITE NO ESTADO DE SÃO PAULO - 2013

(conclusão)				
Nº do animal	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Reticulócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
105	37,00	11,70	31,20	5,34
107	42,00	11,60	27,50	11,44
118	34,10	11,20	32,90	6,16
122	36,60	11,00	30,00	0,00
127	38,00	10,70	28,40	0,00
135	31,20	10,90	34,70	6,08
138	36,40	11,70	32,10	5,22
139	37,00	10,60	28,80	6,22
148	36,60	11,50	31,43	0,00
150	39,00	10,60	27,30	5,42
154	35,00	10,80	30,80	0,00
155	39,00	10,50	27,10	5,61
158	33,90	12,20	36,10	10,62
162	37,00	9,90	26,60	6,34
163	31,40	10,50	33,50	0,00
165	35,30	12,00	34,10	4,82
166	36,00	10,70	29,60	0,00
171	35,00	10,50	29,50	5,64
172	38,00	10,60	27,90	0,00
175	35,00	10,90	31,40	0,00
176	36,40	11,00	30,00	5,48
177	35,80	11,00	30,90	0,00
180	35,10	11,30	32,40	4,85
181	36,00	11,10	30,50	0,00
251	41,00	12,00	29,10	0,00
289	35,00	10,90	30,80	0,00
294	33,00	9,70	29,10	0,00
302	36,00	10,70	29,60	0,00

APÊNDICE C - VALORES INDIVIDUAIS OBTIDOS PARA OS COMPONENTES DO LEUCOGRAMA EM BEZERROS ANÊMICOS DA RAÇA HOLANDESA PRETA E BRANCA, NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA, CRIADOS EM FAZENDAS PRODUTORAS DE LEITE NO ESTADO DE SÃO PAULO - 2013

(continua)

Nº do animal	Leucócitos (x10³/µL)	Neutrófilos (x1/µL)	Basófilos (x1/µL)	Eosinófilos (x1/µL)	Monócitos (x1/µL)	Linfócitos (x1/µL)
3	8,00	3440	0	80	400	4080
4	6,30	1953	63	0	189	4095
5	6,10	1952	0	0	366	3782
9	11,50	4485	115	115	460	6325
11	10,20	4080	102	102	408	5508
13	11,50	4370	115	0	805	6210
15	6,70	2278	67	67	536	3752
16	9,50	2945	95	0	570	5890
17	5,50	1815	0	0	275	3410
20	9,00	2970	0	90	540	5400
21	12,20	4270	0	0	732	7198
22	8,50	4165	0	85	170	4080
25	10,10	4646	0	0	606	4848
26	9,80	6076	0	0	392	3332
27	7,70	3157	154	0	693	3696
28	7,20	3888	72	0	72	3168
32	8,90	4272	0	89	534	4005
34	10,20	4590	0	102	408	5100
41	7,90	3397	79	0	474	3950
42	11,80	2832	0	0	354	8614
43	9,40	3948	0	0	376	5076
44	12,50	6625	125	0	500	5250
45	11,50	4945	115	0	690	5750
48	9,40	3666	188	94	282	5170
50	15,00	5850	450	0	900	7800
55	11,90	4522	0	0	595	6783
56	6,50	3835	0	0	130	2535
58	10,70	6527	0	0	428	3745
64	6,70	2345	67	0	268	4020
66	11,70	4446	234	0	1053	5967
69	10,50	4935	0	0	210	5355
75	5,80	2436	0	0	464	2900
81	8,60	3354	0	86	688	4472
86	7,60	4408	0	0	228	2964
90	9,20	3404	0	92	276	5428
91	8,40	4872	84	84	336	3024
94	10,50	6510	105	0	420	3465
96	9,70	3783	0	0	485	5432
101	8,30	4316	0	0	249	3735
105	7,10	3266	0	71	142	3621
107	6,70	2479	67	0	268	3886

APÊNDICE C - VALORES INDIVIDUAIS OBTIDOS PARA OS COMPONENTES DO LEUCOGRAMA EM BEZERROS ANÊMICOS DA RAÇA HOLANDESA PRETA E BRANCA, NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA, CRIADOS EM FAZENDAS PRODUTORAS DE LEITE NO ESTADO DE SÃO PAULO - 2013
(conclusão)

Nº do animal	Leucócitos (x10³/µL)	Neutrófilos (x1/µL)	Basófilos (x1/µL)	Eosinófilos (x1/µL)	Monócitos (x1/µL)	Linfócitos (x1/µL)
118	7,80	3198	156	78	546	3822
122	9,00	4050	90	0	450	4410
127	7,20	2808	0	0	216	4176
135	7,90	3239	79	0	395	4187
138	7,30	3139	0	0	292	3869
139	8,10	2430	0	81	243	5346
148	9,60	3456	0	0	576	5568
150	7,70	3542	77	0	770	3311
154	6,10	2806	122	0	244	2928
155	3,80	1140	0	0	228	2432
158	7,90	2370	0	79	790	4661
162	9,20	2484	0	92	552	6072
163	7,40	2072	222	74	444	4588
165	8,20	4018	0	0	492	3690
166	8,00	4480	80	80	960	2400
171	11,40	5244	0	0	798	5358
172	7,30	4745	0	73	365	2117
175	7,90	3397	79	0	316	4108
176	8,90	7387	89	89	89	1246
177	9,80	4704	196	0	196	4704
180	3,60	1440	0	72	144	1944
181	6,70	2747	67	67	536	3283
251	10,70	7918	214	0	535	2033
289	7,40	2738	74	74	444	4070
294	11,30	4294	0	0	565	6441
302	8,00	4560	0	0	240	3200

APÊNDICE D - VALORES INDIVIDUAIS OBTIDOS PARA AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE UREIA, DE BILIRRUBINAS TOTAL (BT), DIRETA (BD) E INDIRETA (BI), TEORES DE FERRO TOTAL SÉRICO (FT) E CAPACIDADE TOTAL DE LIGAÇÃO DO FERRO (CTLF) EM BEZERROS ANÊMICOS DA RAÇA HOLANDESA PRETA E BRANCA, NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA, AGRUPADOS SEGUNDO O VOLUME GLOBULAR, CRIADOS EM FAZENDAS PRODUTORAS DE LEITE NO ESTADO DE SÃO PAULO - 2013

(continua)						
Nº do animal	Ureia (mmol/L)	BT (µmol/L)	BD (µmol/L)	BI (µmol/L)	Ferro (µmol/L)	CTLF (µmol/L)
3	3,47	4,62	0,17	4,45	10,20	69
4	2,61	7,35	1,37	5,99	5,40	69
5	3,46	7,35	1,20	6,16	7,10	69
9	2,67	6,50	3,25	3,25	11,00	65
11	3,46	5,81	1,03	4,79	5,50	69
13	3,12	6,33	0,51	5,81	11,90	68
15	3,17	5,99	1,03	4,96	8,90	68
16	3,17	4,96	0,51	4,45	8,70	69
17	3,06	5,13	1,37	3,76	6,50	50
20	3,74	4,45	0,51	3,93	10,00	68
21	4,58	5,30	0,17	5,13	14,60	69
22	5,56	4,10	0,86	3,25	9,00	68
25	3,19	5,64	0,17	5,47	12,10	64
26	4,14	7,35	1,54	5,81	12,40	68
27	4,33	5,30	0,17	5,13	10,70	69
28	3,71	7,01	2,05	4,96	13,50	68
32	4,49	5,64	0,51	5,13	9,00	68
34	3,52	7,52	0,68	6,84	5,90	69
41	4,38	6,67	0,51	6,16	11,30	69
42	4,36	6,67	0,17	6,50	13,30	67
43	3,77	8,21	2,57	5,64	6,00	68
44	4,23	8,55	0,17	8,38	11,00	69
45	4,28	6,67	1,03	5,64	3,90	69
48	2,47	2,57	0,17	2,39	3,70	69
50	4,16	5,81	0,17	5,64	11,00	69
55	6,41	11,12	5,30	5,81	5,30	69
56	6,05	7,18	0,86	6,33	9,10	62
58	5,56	5,99	1,54	4,45	11,40	52
64	4,33	6,33	0,17	6,16	8,80	68
66	2,59	6,67	0,68	5,99	4,70	69
69	5,88	6,50	1,20	5,30	9,10	69
75	3,19	7,01	1,03	5,99	10,10	68
81	3,14	3,42	0,17	3,25	11,80	69
86	2,81	6,50	0,51	5,99	11,20	64
90	4,39	7,01	0,17	6,84	12,40	69
91	3,77	12,83	1,71	11,12	11,00	43
94	5,61	5,81	0,17	5,64	8,20	69
96	4,11	7,87	0,17	7,70	10,80	68
101	3,99	6,67	0,17	6,50	12,10	56

APÊNDICE D - VALORES INDIVIDUAIS OBTIDOS PARA AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE UREIA, DE BILIRRUBINAS TOTAL (BT), DIRETA (BD) E INDIRETA (BI), TEORES DE FERRO TOTAL SÉRICO (FT) E CAPACIDADE TOTAL DE LIGAÇÃO DO FERRO (CTLF) EM BEZERROS ANÊMICOS DA RAÇA HOLANDESA PRETA E BRANCA, NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA, AGRUPADOS SEGUNDO O VOLUME GLOBULAR, CRIADOS EM FAZENDAS PRODUTORAS DE LEITE NO ESTADO DE SÃO PAULO - 2013

Nº do animal	Ureia (mmol/L)	BT (µmol/L)	BD (µmol/L)	BI (µmol/L)	Ferro (µmol/L)	(conclusão)
						CTLF (µmol/L)
105	7,41	3,59	0,34	3,25	3,70	69
107	4,34	5,64	0,17	5,47	8,80	69
118	3,89	13,17	5,47	7,70	9,20	53
122	3,67	10,60	4,62	5,99	8,80	69
127	6,75	7,70	1,20	6,50	3,80	69
135	5,39	10,09	4,28	5,81	9,10	69
138	3,87	7,18	0,17	7,01	8,80	69
139	4,49	3,08	0,17	2,91	8,40	66
148	6,05	4,96	1,54	3,42	11,00	69
150	4,01	12,14	4,45	7,70	4,40	69
154	2,09	4,96	1,54	3,42	11,20	69
155	3,81	7,70	1,54	6,16	10,20	66
158	3,82	7,01	0,51	6,50	9,00	69
162	6,91	5,30	0,17	5,13	14,20	56
163	3,17	5,99	1,03	4,96	8,90	68
165	3,52	7,52	0,68	6,84	5,90	69
166	6,91	6,33	1,20	5,13	13,50	50
171	5,23	6,84	0,68	6,16	9,00	69
172	3,31	5,47	1,03	4,45	13,30	69
175	3,71	7,52	0,17	7,35	12,40	50
176	3,04	5,47	0,86	4,62	17,00	52
177	5,58	6,67	1,37	5,30	11,00	61
180	2,61	7,35	1,37	5,99	5,40	69
181	4,31	3,93	1,88	2,05	10,80	67
251	4,34	3,59	0,68	2,91	17,90	57
289	3,61	3,76	0,51	3,25	4,80	68
294	4,34	5,64	0,17	5,47	8,80	69
302	7,15	6,50	1,37	5,13	9,50	69

APÊNDICE E - VALORES INDIVIDUAIS OBTIDOS PARA AS CONCENTRAÇÕES DE ZINCO PROTOPORFIRINA (ZPP) E OS COMPONENTES DO HEMOGRAMA: NÚMERO DE HEMÁCIAS (HE), TAXA DE HEMOGLOBINA (HB) E VOLUME GLOBULAR (VG), EM BEZERROS SADIOS DA RAÇA HOLANDESA PRETA E BRANCA, NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA, CRIADOS EM FAZENDAS PRODUTORAS DE LEITE NO ESTADO DE SÃO PAULO - 2013

(continua)

Nº do animal	ZPP ($\mu\text{mol ZPP/mol heme}$)	Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hemoglobina (g/dL)	Volume Globular (%)
1	83	7,43	8,40	25
2	71	7,29	8,80	26
6	60	9,51	12,10	35
10	55	7,85	10,40	31
12	103	7,09	8,80	26
23	77	6,98	9,40	28
30	62	7,44	8,90	26
38	67	6,37	9,50	29
39	67	8,90	12,40	37
46	52	7,11	9,80	30
49	75	8,35	12,70	38
52	87	5,89	8,60	27
53	53	6,61	8,90	26
54	46	7,51	11,80	36
60	56	7,05	11,20	34
67	75	6,98	9,50	27
71	59	7,32	10,50	31
73	90	6,72	10,10	29
76	56	8,02	11,70	33
79	61	8,10	12,70	36
80	46	5,67	8,60	25
83	74	8,36	13,20	38
84	45	6,03	8,60	25
85	76	6,45	9,20	28
87	88	7,83	11,50	35
88	69	5,21	9,20	27
89	72	5,45	8,60	25
92	93	6,60	11,20	35
95	84	7,79	9,70	33
100	95	9,48	10,40	37
103	85	7,39	8,70	31
104	86	7,18	8,30	29
106	72	7,59	9,10	30
108	69	7,64	8,50	30
109	95	6,99	8,30	31
110	54	8,95	10,50	38
114	59	8,37	9,50	33
116	64	8,98	11,30	40

APÊNDICE E - VALORES INDIVIDUAIS OBTIDOS PARA AS CONCENTRAÇÕES DE ZINCO PROTOPORFIRINA (ZPP) E OS COMPONENTES DO HEMOGRAMA: NÚMERO DE HEMÁCIAS (HE), VOLUME GLOBULAR (VG), TAXA DE HEMOGLOBINA (HB), EM BEZERROS SADIOS DA RAÇA HOLANDESA PRETA E BRANCA, NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA, CRIADOS EM FAZENDAS PRODUTORAS DE LEITE NO ESTADO DE SÃO PAULO - 2013

(conclusão)				
Nº do animal	ZPP ($\mu\text{mol ZPP/mol heme}$)	Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hemoglobina (g/dL)	Volume Globular (%)
119	51	6,95	7,20	26
120	58	9,72	10,80	40
124	74	7,56	8,00	29
125	78	6,70	7,30	25
126	80	7,75	8,70	32
128	56	8,66	9,20	33
129	68	8,95	9,70	37
130	62	8,09	8,80	35
137	79	7,89	8,80	35
140	42	8,58	9,30	34
141	58	8,59	9,00	32
144	58	8,64	9,50	35
145	54	7,30	8,20	29
146	87	7,72	8,30	30
147	71	7,66	8,40	31
149	95	7,58	8,00	28
151	72	6,62	6,80	25
152	64	7,74	8,20	31
153	70	8,66	9,00	34
156	56	8,28	8,60	32
161	61	9,47	10,00	40
164	66	7,65	8,00	29
167	76	7,96	8,10	30
173	65	6,69	7,10	27
174	63	8,55	9,50	35
178	61	8,20	9,80	38
216	64	7,25	9,70	28
257	62	8,02	9,40	34
258	51	6,95	7,20	26

APÊNDICE F - VALORES INDIVIDUAIS OBTIDOS PARA OS ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO (VCM), HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA (HCM), CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA (CHCM), E RETICULOCITOMETRIA EM BEZERROS SADIOS DA RAÇA HOLANDESA PRETA E BRANCA, NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA, CRIADOS EM FAZENDAS PRODUTORAS DE LEITE NO ESTADO DE SÃO PAULO - 2013

(continua)

Nº do animal	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Reticulócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
1	33,40	11,30	33,80	0,00
2	36,30	12,00	33,30	0,00
6	37,20	12,70	34,20	0,00
10	39,20	13,20	33,80	0,00
12	36,50	12,40	34,10	0,00
23	40,80	13,40	33,00	0,00
30	35,50	11,90	33,70	7,44
38	44,90	14,90	33,20	0,00
39	41,30	13,90	33,70	0,00
46	42,00	13,70	32,80	0,00
49	45,80	15,20	33,20	8,35
52	45,10	14,60	32,40	11,78
53	39,90	13,40	33,80	0,00
54	48,00	15,70	32,70	0,00
60	48,70	15,80	32,60	0,00
67	38,50	13,60	35,40	6,98
71	42,20	14,30	34,00	0,00
73	43,10	15,00	34,90	6,72
76	41,70	14,50	35,00	16,04
79	44,60	15,60	35,10	8,10
80	43,50	15,10	34,90	5,67
83	45,80	15,70	34,50	0,00
84	40,90	14,20	34,90	6,03
85	43,50	14,20	32,80	6,45
87	44,20	14,60	33,20	7,83
88	52,70	17,60	33,50	0,00
89	46,40	15,70	34,10	5,45
92	52,30	16,90	32,40	0,00
95	42,00	12,40	29,30	0,00
100	39,00	11,00	28,30	0,00
103	42,00	11,80	28,10	7,39
104	40,00	11,60	28,70	14,36
106	40,00	11,90	29,8	7,59
108	39,00	11,10	28,30	0,00
109	44,00	11,80	26,90	6,99
110	43,00	11,70	27,50	0,00
114	39,00	11,30	29,10	8,37
116	45,00	12,60	28,00	8,98
119	37,00	10,30	28,20	6,95

APÊNDICE F - VALORES INDIVIDUAIS OBTIDOS PARA OS ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO (VCM), HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA (HCM), CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA (CHCM), E RETICULOCITOMETRIA EM BEZERROS SADIOS DA RAÇA HOLANDESA PRETA E BRANCA, NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA, CRIADOS EM FAZENDAS PRODUTORAS DE LEITE NO ESTADO DE SÃO PAULO - 2013

Nº do animal	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	(conclusão)
				Reticulócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
120	41,00	11,10	27,30	0,00
124	39,00	10,60	27,30	0,00
125	37,00	10,80	29,00	0,00
126	41,00	11,20	27,30	0,00
128	38,00	10,70	27,80	0,00
129	42,00	10,90	26,00	0,00
130	43,00	10,80	25,40	0,00
137	44,00	11,20	25,50	7,89
140	39,00	10,90	27,80	17,16
141	38,00	10,50	27,90	8,59
144	40,00	10,90	27,40	8,64
145	39,00	11,20	28,30	7,30
146	39,00	10,80	27,80	0,00
147	40,00	11,00	27,20	0,00
149	37,00	10,60	28,40	0,00
151	38,00	10,30	27,50	0,00
152	39,00	10,70	27,00	0,00
153	39,00	10,40	26,90	0,00
156	39,00	10,40	26,80	8,28
161	43,00	10,60	24,90	0,00
164	38,00	10,40	27,70	0,00
167	38,00	10,20	27,10	0,00
173	40,00	10,60	26,40	0,00
174	41,00	11,20	27,10	0,00
178	46,00	12,00	26,00	0,00
216	38,80	13,30	34,50	0,00
257	43,00	11,70	27,40	0,00
258	37,00	10,30	28,20	0,00

APÊNDICE G - VALORES INDIVIDUAIS OBTIDOS PARA OS COMPONENTES DO LEUCOGRAMA EM BEZERROS SADIOS DA RAÇA HOLANDESA PRETA E BRANCA, NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA, CRIADOS EM FAZENDAS PRODUTORAS DE LEITE NO ESTADO DE SÃO PAULO - 2013

(continua)

Nº do animal	Leucócitos (x10³/µL)	Neutrófilos (x1/µL)	Basófilos (x1/µL)	Eosinófilos (x1/µL)	Monócitos (x1/µL)	Linfócitos (x1/µL)
1	7,40	3552	74	74	296	3404
2	11,00	4290	110	110	220	6270
6	7,70	2156	77	0	539	4928
10	7,40	2516	148	74	666	3996
12	9,90	3366	99	0	297	6138
23	13,80	5658	138	138	138	7728
30	5,20	1404	52	52	520	3172
38	8,90	4094	89	89	534	4094
39	10,60	4452	0	0	1378	4770
46	8,30	4980	83	0	996	2241
49	8,60	4386	172	86	602	3354
52	5,20	2080	104	52	104	2860
53	7,90	4661	79	0	790	2370
54	7,50	5025	0	0	300	2175
60	9,40	4512	0	0	94	4794
67	14,20	6532	0	142	142	7384
71	10,50	6300	105	0	1155	2940
73	7,40	2960	74	0	962	3404
76	7,00	1890	70	0	560	4480
79	11,00	5500	220	0	440	4840
80	13,10	3013	0	0	0	10087
83	8,50	3825	0	85	595	3995
84	8,20	3280	0	0	82	4838
85	4,80	1872	0	0	0	2928
87	10,50	6405	105	0	840	3150
88	8,20	3772	0	0	246	4182
89	5,10	2499	0	51	51	2499
92	8,30	5727	0	0	498	2075
95	6,20	1116	0	0	620	4464
100	8,90	4984	89	89	801	2937
103	9,10	5551	91	0	273	3185
104	6,40	2112	0	0	256	4032
106	5,30	954	0	53	1060	3233
108	6,20	1860	0	0	372	3968
109	5,20	1768	156	52	52	3172
110	6,10	2501	0	122	854	2623
114	9,90	5247	99	99	198	4257
116	4,10	1435	41	0	492	2132
119	6,30	2646	0	0	63	3591
120	4,40	1452	88	132	44	2684
124	10,00	5900	0	0	100	4000

APÊNDICE G - VALORES INDIVIDUAIS OBTIDOS PARA OS COMPONENTES DO LEUCOGRAMA EM BEZERROS SADIOS DA RAÇA HOLANDESA PRETA E BRANCA, NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA, CRIADOS EM FAZENDAS PRODUTORAS DE LEITE NO ESTADO DE SÃO PAULO - 2013
(conclusão)

Nº do animal	Leucócitos (x10³/µL)	Neutrófilos (x1/µL)	Basófilos (x1/µL)	Eosinófilos (x1/µL)	Monócitos (x1/µL)	Linfócitos (x1/µL)
125	8,00	4080	0	0	1200	2720
126	6,70	3484	0	0	134	3082
128	5,90	2419	118	0	295	3068
129	6,50	4745	65	130	130	1430
130	5,40	2808	0	0	108	2484
137	9,80	5978	98	98	294	3332
140	7,50	4425	75	75	300	2625
141	7,80	2262	78	78	702	4680
144	8,30	4316	0	0	83	3901
145	10,20	6222	0	0	306	3672
146	11,20	4592	224	0	224	6160
147	9,30	5952	93	0	372	2883
149	9,80	4018	98	0	392	5292
151	4,40	2816	0	0	352	1232
152	9,50	5225	0	0	0	4275
153	11,30	5424	0	113	113	5650
156	4,10	2419	41	41	123	1476
161	10,40	7488	0	0	312	2600
164	7,20	4248	72	0	1008	1872
167	7,90	4582	0	79	790	2449
173	5,90	4012	59	59	177	1593
174	8,20	5412	82	82	246	2378
178	6,30	4410	126	126	441	1197
216	7,30	5694	0	0	0	1606
257	9,40	3008	0	0	282	6110
258	6,30	1386	63	0	0	4851

APÊNDICE H - VALORES INDIVIDUAIS OBTIDOS PARA AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE UREIA, DE BILIRRUBINAS TOTAL (BT), DIRETA (BD) E INDIRETA (BI), TEORES DE FERRO TOTAL SÉRICO (FT) E CAPACIDADE TOTAL DE LIGAÇÃO DO FERRO (CTLF) EM BEZERROS SÁDIOS DA RAÇA HOLANDESA PRETA E BRANCA, NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA, AGRUPADOS SEGUNDO O VOLUME GLOBULAR, CRIADOS EM FAZENDAS PRODUTORAS DE LEITE NO ESTADO DE SÃO PAULO - 2013

(continua)

Nº do animal	Ureia (mmol/L)	BT (µmol/L)	BD (µmol/L)	BI (µmol/L)	Ferro (µmol/L)	CTLF (µmol/L)
1	2,7555	5,64	0,17	5,47	23,80	59
2	5,6947	4,96	0,68	4,28	14,30	58
6	2,8223	6,16	0,68	5,47	29,00	59
10	3,1229	6,84	1,54	5,30	15,30	59
12	3,7408	7,70	1,54	6,16	13,50	58
23	3,1229	6,84	1,54	5,30	15,30	59
30	2,7388	7,01	1,37	5,64	17,40	59
38	5,6947	4,96	0,68	4,28	14,30	58
39	3,7074	3,76	0,17	3,59	19,30	52
46	3,8577	7,87	1,54	6,33	14,30	59
49	4,2084	4,45	1,03	3,42	19,00	55
52	4,843	8,38	1,88	6,50	16,20	54
53	6,9305	6,33	1,20	5,13	12,20	44
54	8,6673	4,96	1,71	3,25	17,90	47
60	6,4462	6,50	0,51	5,99	26,90	39
67	7,1643	6,16	0,34	5,81	13,00	59
71	6,9138	6,33	1,20	5,13	13,50	50
73	3,7408	7,70	1,54	6,16	13,50	58
76	3,674	9,75	0,34	9,41	18,80	56
79	1,837	5,64	0,34	5,30	22,00	45
80	6,8303	7,52	2,57	4,96	15,30	40
83	3,3233	6,84	1,03	5,81	25,80	50
84	4,4422	10,09	2,57	7,52	13,50	59
85	2,9893	7,01	2,05	4,96	13,60	48
87	3,3233	6,84	1,03	5,81	25,80	50
88	3,674	9,75	0,34	9,41	18,80	56
89	4,5424	7,18	2,05	5,13	13,40	59
92	3,9746	12,14	3,42	8,72	14,20	34
95	3,9078	4,10	0,34	3,76	23,00	58
100	3,2231	5,13	0,68	4,45	21,00	54
103	6,3794	6,84	0,86	5,99	13,10	59
104	4,5424	7,18	2,05	5,13	13,40	59
106	3,4569	6,16	1,20	4,96	12,80	59
108	5,3273	8,04	2,74	5,30	13,10	58
109	5,6279	5,81	1,20	4,62	13,70	59
110	7,014	3,93	0,17	3,76	18,50	52
114	6,8303	7,52	2,57	4,96	15,30	40
116	3,3233	9,06	2,22	6,84	14,50	36
119	2,7221	4,62	0,17	4,45	25,50	48

APÊNDICE H - VALORES INDIVIDUAIS OBTIDOS PARA AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE UREIA, DE BILIRRUBINAS TOTAL (BT), DIRETA (BD) E INDIRETA (BI), TEORES DE FERRO TOTAL SÉRICO (FT) E CAPACIDADE TOTAL DE LIGAÇÃO DO FERRO (CTLF) EM BEZERROS SADIOS DA RAÇA HOLANDESA PRETA E BRANCA, NO PRIMEIRO MÊS DE VIDA, AGRUPADOS SEGUNDO O VOLUME GLOBULAR, CRIADOS EM FAZENDAS PRODUTORAS DE LEITE NO ESTADO DE SÃO PAULO - 2013

							(conclusão)
Nº do animal	Ureia (mmol/L)	BT (µmol/L)	BD (µmol/L)	BI (µmol/L)	Ferro (µmol/L)	CTLF (µmol/L)	
120	3,6907	13,00	4,96	8,04	28,90	24	
124	7,1643	6,16	0,34	5,81	13,00	59	
125	3,0561	7,01	1,88	5,13	12,50	59	
126	7,1643	6,16	0,34	5,81	13,00	59	
128	6,2458	4,96	0,68	4,28	15,20	55	
129	5,0267	6,33	1,54	4,79	23,80	41	
130	7,0641	8,21	1,20	7,01	14,80	39	
137	6,8971	7,70	3,25	4,45	16,50	55	
140	2,7221	4,62	0,17	4,45	25,50	48	
141	4,7428	14,02	5,13	8,89	13,10	44	
144	3,0394	5,47	0,86	4,62	17,00	52	
145	3,7408	7,70	1,54	6,16	13,50	58	
146	6,2458	4,96	0,68	4,28	15,20	55	
147	11,356	5,47	0,86	4,62	13,30	59	
149	2,1543	8,21	1,71	6,50	18,30	58	
151	2,5384	6,67	1,54	5,13	17,10	59	
152	3,2565	7,35	4,28	3,08	12,70	59	
153	4,342	3,59	0,68	2,91	17,90	57	
156	3,1229	6,84	1,54	5,30	15,30	59	
161	3,507	6,84	2,05	4,79	13,90	40	
164	3,6907	6,84	2,39	4,45	13,60	58	
167	4,1583	9,41	3,93	5,47	15,00	54	
173	4,2919	2,91	0,68	2,22	11,10	58	
174	6,9138	6,33	1,20	5,13	13,50	50	
178	4,0748	9,23	2,05	7,18	17,60	37	
216	6,4462	7,18	0,34	6,84	14,70	58	
257	2,9225	5,47	1,03	4,45	14,90	57	
258	4,175	7,87	1,37	6,50	14,80	59	