RAIMUNDO ALVES BARRÊTO JÚNIOR

**ESTUDO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO E TRATAMENTO DE
HIPOCALCEMIA EM BOVINOS E EQÜINOS**

São Paulo

2007

RAIMUNDO ALVES BARRÊTO JÚNIOR

**Estudo de um modelo experimental de indução e tratamento de hipocalcemia
em bovinos e eqüinos**

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 Medicina Veterinária

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani

São Paulo

2007

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.1885
FMVZ

Barrêto Júnior, Raimundo Alves

Estudo de um modelo experimental de indução e tratamento de hipocalcemia em bovinos e eqüinos / Raimundo Alves Barreto Júnior. – São Paulo: R. A. Barreto Júnior, 2007.
95 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani.

1. Hipocalcemia. 2. Indução experimental. 3. Tratamento.
4. Bovinos. 5. Eqüinos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da eficácia do tratamento com cálcio, fósforo e magnésio em bovinos e eqüinos com hipocalcemia", protocolado sob o nº1165/2007, utilizando 12 (doze) vacas e 12 (doze) éguas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Efficacy of calcium, phosphorus and magnesium treatment on hypocalcaemia in bovine and equine", protocol number 1165/2007, utilizing 24 (twenty four) bovines, under the responsibility Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 15 de agosto de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BARRÊTO JÚNIOR, Raimundo Alves

Título: Estudo de um modelo experimental de indução e tratamento de hipocalcemia em bovinos e eqüinos.

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 Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedico esta tese:

*A meus pais **RAIMUNDO ALVES BARRETO** (in memorian) e **VALDELICE LIMA BARRETO**, meus exemplos de vida e principais incentivadores para o meu crescimento profissional.*

*A meu filho **Arthur Ramos Barrêto**, motivo de tudo que eu faço de bom desde 04/07/1999.*

*A meus irmãos **Antônio Raimundo Lima Barrêto (TOINHO)**, **Rita Carlota Lima Barreto do Nascimento (RITA)**, **Rosa Graça Lima Barrêto (GAL)**, **Rosânia Lima Barrêto (Zane)**, **Rosilma Lima Barrêto (Zil)**, **Karla Herlanger Lima Barrêto (Karlota)** e **Bárbara Rachel Lima Barrêto (Barbicha)**, por todo amor e carinho que sempre tiveram comigo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, o grande arquiteto do universo.

Ao Prof. **ENRICO LIPPI ORTOLANI** pela amizade, horas de agradável convívio e pelo exemplo de ser humano, pesquisador, professor e orientador.

A **Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA)**, pela minha liberação para cursar o doutorado.

Ao laboratório **Vallée S.A.** pela doação da solução contendo cálcio e pelo apoio logístico para o desenvolvimento deste trabalho de tese.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de doutorado.

A todos os **amigos professores da UFERSA**, em especial, aqueles que me ajudaram durante o afastamento. Não citarei nomes para não cometer injustiça.

Aos meus sobrinhos, **Bruno, José Enéas, Ana Beatriz, Gabriela, Maria Luísa, Luísa, João Marcelo, Maria Eduarda, Ana Luísa, Mateus e Tomás**, pelo carinho e bons momentos juntos. Em especial aos meus afilhados **Hannah Jéssica e Hugo Enéas**.

Aos eternos amigos ou irmãos, **Faviano Ricceli da Costa Moreira, Frederico Ozanan Barros Monteiro e Marcelo Barbosa Bezerra**, pela grande amizade.

Aos meus grandes amigos ou novos irmãos **Ubiraem Schalch, Alexandre Coutinho Antonelli, Antonio Humberto Hamad Minervino, Flávio Ribeiro Alves e Genilson Fernandes Queiroz**, pela amizade indiscutível e apoio em todas as horas, não sei o que teria feito sem vocês!

A minha namorada **Carolina Cabral de Araújo**, que apesar do pouco tempo que estamos juntos, já se fez muito importante para mim, e me apoiou em grandes momentos da minha vida.

As amigas ou novas irmãs, ***Maria Cláudia Araripe Sucupira, Alice Maria Melville Paiva Della Libera e Elizabeth Bohland***, pela amizade, carinho e agradável convivência.

Aos amigos ***Alexandre Schmaedeck, Frederico Mazzoca, João Paulo Saut e Rafael Cardoso***, por estarem ao meu lado e agradável convívio.

Aos amigos ***Pacheco, "Zico", Paulo, Maria Cecília, Maria Paula, "Dona Nice", Rosangela, Vanderlei, Gérson, João, Josane, Ana paula e Sirley***, pela amizade, ensinamentos e agradável convívio neste ano de Pirassununga.

A ***Clara Satsuki Mori e Marly Ferreira de Castro*** pela amizade, paciência e irrestrita ajuda na realização das análises laboratoriais

A todos os professores da FMVZ, em especial, ***Fernando José Benesi, Lilian Gregory, Eduardo Harry Birguel Júnior e Wilson Roberto Fernandes***, pelo agradável convívio e conhecimentos transmitidos.

Aos amigos da "Família Ortolani", ***Celso Maruta, Sandra Kitamura, Alessandra Lima, Pierre Castro Soares, Néria dos Santos, Bruno Caputi, Rodrigo Ferreira, Beatriz Venturelli e Leonardo Frasson***, pela convivência harmoniosa e carinho.

Ao funcionário do Galpão de ruminantes ***Agnaldo dos Santos***, por toda sua ajuda no trato dos animais, na condução de vários experimentos, nas colheitas e na manutenção do galpão.

As secretárias ***Adelaide Borges e Maria Aparecida***, por toda ajuda durante o doutorado e pelo carinho a mim dispensado.

A ***todos os funcionários*** da Biblioteca da FMVZ/USP, em especial a ***Dona Helena*** e a ***Dona Elza***, pelo profissionalismo e atenção com os quais sempre fui atendido.

As Médicas Veterinárias do laboratório clínico do HOVET, **Samantha e Maria Luíza**, e aos funcionários do VCM **Cláudia, Carmem, Dinha, Patricia, Toninho e Geraldo** pelo constante auxílio e agradável convivência.

Aos funcionários do Hospital de Equinos, em especial aos meus amigos **Márcio, Marquinhos, Rosendo, Ganga, Gervásio e Osmar** e aos funcionários do Hospital de Ruminantes **Luizinho, Edson, Elias e Francisco** pela constante ajuda e pela amizade.

Aos amigos da pós-graduação: **Tio Chico, Raquel, Fernanda, Ewaldo, Fábio, Marcelo, Enoc, Mariana, Maiara, Cadú, Matheus Tajra, Andréa e outros aqui não citados**, pela amizade e convivência harmoniosa.

Aos meus eternos **amigos da UEMA**.

Aos bovinos e eqüinos que fizeram parte do experimento e foram essenciais para realização deste trabalho.

RESUMO

BARRÊTO JÚNIOR, R. A. **Estudo de um modelo experimental de indução e tratamento de hipocalcemia em bovinos e eqüinos.** [Study of an experimental induction model and treatment of hypercalcemia in bovines and equines]. 2007. 95 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O presente trabalho objetivou validar o modelo experimental de indução de hipocalcemia, por meio de solução de EDTA, utilizado em bovinos para a espécie eqüina, bem como estudar o quadro sintomatológico, algumas variáveis bioquímicas e a resposta ao tratamento com cálcio. Foram utilizados 24 animais, 12 novilhas e 12 éguas, aleatoriamente distribuídos em 5 animais nos grupos controles e 7 animais nos grupos tratados em cada espécie. Foi injetado continuamente através de cateter intravenoso, uma solução de ácido etilenodiaminotetracético dissódico (EDTA) a 5% com pH ajustado para 7,4, e com velocidade controlada de 220 mL/hora, até que o animal apresenta-se os sinais clínicos clássicos de hipocalcemia como decúbito esternal com posição de auto-auscultação ou decúbito lateral. O grupo tratado com cálcio foi imediatamente medicado com uma solução contendo 2,44 g de cálcio, 0,47 g de fósforo, 0,185 g de magnésio e 5 g de glicose para cada 100 mL, na dose de 1 mL/kg/PV, no decorrer de 30 minutos. O grupo controle foi infundido com uma solução fisiológica de cloreto de sódio na mesma velocidade utilizada para a solução de cálcio. Após este período os animais do grupo controle foram tratados com o mesmo produto e protocolo supracitado para recuperação dos animais. Um minucioso exame físico, bem como coleta de amostras sangüíneas foram realizados nos tempos **T0** (antes do início da infusão de EDTA), **T1** (Fase I caracterizada por tremores musculares), **T2** (ao final da infusão com EDTA), **T3** (Após o término do tratamento) e **T4** (24 horas após o término do experimento). Todas as novilhas mostraram diminuição temporária da concentração de cálcio total e livre, fósforo

sérico, e apresentaram quadro clássico de hipocalcemia. A taquicardia e a hipofonese desapareceram no decorrer do tratamento, sendo também observado aumento significativo no cálcio livre e total, e fósforo sérico. Nos eqüinos, o modelo produziu queda nos valores séricos de cálcio total e livre, e de magnésio, além de quadro clássico de hipocalcemia, semelhante a casos clínicos relatados e ao quadro experimental em bovinos. Taquicardia, hipofonese, atonia cecal e meteorismo decorrente da hipocalcemia foi gradativamente desaparecendo com o tratamento, voltando a frequência cardíaca a valores basais após o tratamento. O modelo experimental de indução de hipocalcemia usado classicamente em bovinos foi bastante eficiente para desenvolver um quadro clínico característico desta enfermidade em eqüinos, sendo este facilmente corrigido em ambas espécies com o uso da solução utilizada no tratamento.

Palavras-chave: Hipocalcemia. Indução Experimental. Tratamento. Bovinos. Eqüinos.

ABSTRACT

BARRÊTO JÚNIOR, R. A. **Study of an experimental induction model and treatment of hypocalcemia in bovines and equines.** [Estudo de um modelo experimental de indução e tratamento de hipocalcemia em bovinos e eqüinos]. 2007. 95 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The present study aims to validate in equine the induction model of hypocalcemia used in bovine by EDTA infusion and study the clinical picture, biochemical profile and treatment response in both species. Were utilized 24 animals, 12 heifers and 12 mares randomly distributed in seven animals on treated group and five animals on control group in each species. The induction model was carried on by continuous EDTA infusion into jugular vein, with control speed of 220 mL/hour, until the animals present clinical signs of hypocalcemia such as lateral decumbency and self-auscultation attitude. After that, the treated group received a calcium (Ca) solution (2.44 g/ 100 mL) enriched with phosphorus (P) (0.47 g/ 100 mL), magnesium (Mg) (0.185 g/ 100 mL) and glucose (5 g/ 100 mL) with a dose of 1 mL/kg of body weight in 30 minutes, in while, the control group was treated with the same dose of saline solution (0.9 %). Clinical examination and blood withdraws were performed in times T0 (basal time), T1 (beginning of hypocalcemia); T2 (end of EDTA infusion); T3 (end of treatment) and T4 (24 hours after the induction). All the heifers show temporary blood calcium and phosphorus reduction and present classical clinical picture of hypocalcemia. The treated group present fully clinical recovery and blood calcium and P increasing. In mares the induction model provokes fall of Ca and Mg and the animal presented a classical picture of hypocalcemia closely to the presented by the heifers. Most evident signs were increasing heart beat, hypophonesis, cecal atony, muscular contractions and crescent inquietation; followed by decumbency and apathy. Those symptoms were reversed after calcium treatment. For some of the

variables study, significative difference between the groups in T3 was found in bovine (ruminal movements; time for capillary fulfilling – TCF; blood Ca) and equine (cecal movements; blood Ca and Mg). The experimental model classically used on bovines performed excellent in mares, with animal safety and efficacy on provokes hypocalcemia clinical sings. The syndrome was easily corrected, in both species, by calcium solution.

Key words: Hypocalcemia. Experimental induction. Treatment. Bovine. Equine.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição bromatológica e mineral das dietas fornecidas aos bovinos e eqüinos - São Paulo - 2007	35
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Valores médios da frequência cardíaca (bat/min) dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007.....	47
Gráfico 2 -	Valores médios da frequência respiratória (mov/min) dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	48
Gráfico 3 -	Valores médios dos movimentos ruminais (mov/3') dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007.....	49
Gráfico 4 -	Valores médios da temperatura retal (°C) dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	50
Gráfico 5 -	Valores médios do tempo de preenchimento capilar dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007.....	51
Gráfico 6 -	Valores médios da frequência cardíaca (bat/min) dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007.....	55
Gráfico 7 -	Valores médios da frequência respiratória (mov/min) dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	56
Gráfico 8 -	Valores médios dos movimentos cecais (mov/3') dos eqüinos nos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007.....	57
Gráfico 9 -	Valores médios da temperatura retal (°C) dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	58
Gráfico 10 -	Valores médios e desvios padrão do tempo de preenchimento capilar dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	59
Gráfico 11 -	Valores médios do Cálcio sérico total dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	61
Gráfico 12 -	Valores médios do Cálcio ionizável dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	62

Gráfico 13 - Valores médios do Fósforo sérico dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	63
Gráfico 14 - Valores médios do Magnésio sérico dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	64
Gráfico 15 - Valores médios de Proteína total sérica dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	65
Gráfico 16 - Valores médios de Albumina sérica dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	66
Gráfico 17 - Valores médios de Glicose plasmática dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	67
Gráfico 18 - Valores médios de atividade da aspartato aminotransferase dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	68
Gráfico 19 - Valores médios de atividade da gama glutamiltransferase dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	69
Gráfico 20 - Valores médios de atividade da creatina quinase sérica dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	70
Gráfico 21 - Valores médios do Cálcio sérico total dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	72
Gráfico 22 - Valores médios do Cálcio ionizável dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	73
Gráfico 23 - Valores médios do Fósforo sérico dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	74
Gráfico 24 - Valores médios do Magnésio sérico dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	75
Gráfico 25 - Valores médios de Proteína total sérica dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	76
Gráfico 26 - Valores médios de Albumina sérica dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	77
Gráfico 27 - Valores médios de Glicose plasmática dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	78

Gráfico 28 - Valores médios de atividade da aspartato aminotransferase dos equinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	79
Gráfico 29 - Valores médios de atividade da gama glutamiltransferase dos equinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	80
Gráfico 30 - Valores médios de atividade da creatina quinase sérica dos equinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores médios e desvios padrão da frequência cardíaca (bat/min) nos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007.....	47
Tabela 2 -	Valores médios e desvios padrão da frequência respiratória (mov/min) nos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007.....	48
Tabela 3 -	Valores médios e desvios padrão dos movimentos ruminais (mov/3') dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007.....	49
Tabela 4 -	Valores médios e desvios padrão da temperatura retal (°C) dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	50
Tabela 5 -	Valores médios e desvios padrão do tempo de preenchimento capilar dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	51
Tabela 6 -	Valores médios e desvios padrão da frequência cardíaca (bat/min) dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007.....	54
Tabela 7 -	Valores médios e desvios padrão da frequência respiratória (mov/min) dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007.....	55
Tabela 8 -	Valores médios e desvios padrão dos movimentos cecais (mov/3') dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007.....	56
Tabela 9 -	Valores médios e desvios padrão da temperatura retal (°C) dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	57
Tabela 10 -	Valores médios e desvios padrão do tempo de preenchimento capilar dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	58
Tabela 11 -	Valores médios e desvios padrão do Cálcio sérico total dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	61

Tabela 12 - Valores médios e desvios padrão do Cálcio ionizável dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	62
Tabela 13 - Valores médios e desvios padrão do Fósforo sérico dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007.....	63
Tabela 14 - Valores médios e desvios padrão do Magnésio sérico dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	64
Tabela 15 - Valores médios e desvios padrão de Proteína total sérica dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	65
Tabela 16 - Valores médios e desvios padrão de Albumina sérica (g/dL) dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	66
Tabela 17 - Valores médios e desvios padrão da Glicose plasmática dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	67
Tabela 18 - Valores médios e desvios padrão da atividade da aspartato aminotransferase (U/L) a 30 °C dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	68
Tabela 19 - Valores médios e desvios padrão da atividade da gama glutamiltransferase (U/L) a 30 °C dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	69
Tabela 20 - Valores médios e desvios padrão da atividade da creatina quinase sérica (U/L) a 30 °C dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	70
Tabela 21 - Valores médios e desvios padrão do Cálcio sérico total dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	72
Tabela 22 - Valores médios e desvios padrão do Cálcio ionizável dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	73
Tabela 23 - Valores médios e desvios padrão do Fósforo sérico dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007.....	74

Tabela 24 - Valores médios e desvios padrão do Magnésio sérico dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	75
Tabela 25 - Valores médios e desvios padrão de Proteína total sérica dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	76
Tabela 26 - Valores médios e desvios padrão de Albumina sérica (g/dL) dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	77
Tabela 27 - Valores médios e desvios padrão da Glicose plasmática dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	78
Tabela 28 - Valores médios e desvios padrão da atividade da aspartato aminotransferase (U/L) a 30 °C dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	79
Tabela 29 - Valores médios e desvios padrão da atividade da gama glutamiltransferase (U/L) a 30 °C dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	80
Tabela 30 - Valores médios e desvios padrão da atividade da creatina quinase sérica (U/L) a 30 °C dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AST	aspartato aminotransferase
Ca	Cálcio
CK	creatina quinase
DP	desvio padrão
EDTA	ácido dietilenodiaminotetracético dissódico
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	Grama
G	Gravidade
GGT	gama glutamiltransferase
h	Horas
kg	Quilograma
L	Litro
m ²	metro quadrado
Mg	Magnésio
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimol
MS	matéria seca
N	Normal
nº	Número
P	Fósforo
<i>P</i>	nível de significância
PTH	Paratormônio

PV	peso vivo
r.p.m.	rotações por minuto
U	Unidade
USP	Universidade de São Paulo
μmol	Micromol

LISTA DE SÍMBOLOS

/	Divisão
°C	graus Celsius
=	Igual
>	Maior
+	Adição
±	mais ou menos
®	marca registrada
<	menor
-	Subtração
%	Porcentagem
√	raiz quadrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
3	OBJETIVOS	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	ANIMAIS E ALIMENTAÇÃO.....	34
4.2	INSTALAÇÕES.....	36
4.3	DELINEAMENTO E PROTOCOLO EXPERIMENTAL	36
4.4	EXAME CLÍNICO DOS ANIMAIS.....	37
4.5	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS SANGÜÍNEAS	39
4.5.1	Determinação da concentração sérica de cálcio (Ca)	40
4.5.2	Determinação da concentração sérica de fósforo (P)	40
4.5.3	Determinação da concentração sérica de magnésio (Mg)	40
4.5.4	Determinação da concentração plasmática da glicose	41
4.5.5	Determinação concentração sérica de proteína total	41
4.5.6	Determinação da concentração sérica de albumina	41
4.5.7	Determinação da atividade da aspartato aminotransferase (AST) ..	42
4.5.8	Determinação da atividade da gama glutamiltransferase (GGT)	42
4.5.9	Determinação da atividade da creatina quinase (CK)	42
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5	RESULTADOS	45
5.1	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	45
5.1.1	Quadro clínico dos bovinos	45
5.1.2	Quadro clínico dos eqüinos	52
5.2	VARIÁVEIS DO PERFIL BIOQUÍMICO SANGÜÍNEO	60
5.2.1	Perfil bioquímico dos bovinos	60
5.2.2	Perfil bioquímico dos eqüinos	71
6	DISCUSSÃO	82
7	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

O cálcio (Ca) é um macroelemento essencial na formação do esqueleto, coagulação do sangue, regulação do ritmo cardíaco, excitabilidade neuromuscular, ativação enzimática, permeabilidade de membranas entre outras importantes funções (McDOWELL, 1999; UNDERWOOD; SUTTLE, 1999). O organismo animal tem um sistema de regulação muito controlado das concentrações de cálcio ionizável no sangue, as quais têm que permanecer dentro de patamares restritos, ou graves conseqüências poderão advir tanto da hipo como da hipercalcemia.

Embora casos de hipercalcemia sejam descrita na literatura a hipocalcemia é uma das principais enfermidades metabólicas em fêmeas de várias espécies animais, em especial durante o período do puerpério (RADOSTITS et al., 2007). Entre as várias espécies animais destaca-se o surgimento de hipocalcemia em maior grau nas vacas de aptidão leiteira, sendo também citada em éguas.

A hipocalcemia da vaca parturiente tem caráter agudo e ocorre geralmente 72 horas após o parto, caracterizada por disfunção metabólica temporária da normocalcemia causada por várias condições predisponentes e determinantes que culminam com diminuição em tal grau dos teores de cálcio no sangue que provocam um complexo e seqüencial quadro clínico composto por três fases distintas. Na primeira delas o quadro geral é marcado por uma excitabilidade nervosa, seguida por outras duas fases caracterizadas por sintomas de depressão nervosa, culminando num desfecho fatal em 75 % dos casos não tratados (ORTOLANI, 1995; CESCO et al., 2004).

Embora esta enfermidade já acontecesse nos rebanhos nacionais, o estudo pioneiro que avaliou a incidência de hipocalcemia em vacas leiteiras parturientes em

nosso meio se desenvolveu apenas na década de 90 (ORTOLANI, 1995). Nesse trabalho apurou-se uma incidência relativamente alta (4,25%) da enfermidade em seis propriedades leiteiras no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo, descrevendo ainda vários detalhes do quadro clínico e da eficácia da terapia. Já em eqüinos, os trabalhos encontrados em nosso meio referem-se basicamente a relatos de casos isolados descritos também recentemente (FERNANDES et al., 1995; CHIACHIO et al., 2005).

A manutenção da normocalcemia é vital para a sobrevivência e a homeostase de vários processos funcionais dos animais domésticos (McDOWELL, 1999; UNDERWOOD; SUTTLE, 1999). Para proporcionar tal condição, vários e complexos mecanismos são empregados pelo organismo, destacando-se o papel regulatório de alguns hormônios nesse processo, os quais serão descritos de forma pormenorizada no capítulo de revisão de literatura a seguir.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O CÁLCIO E A HIPOCALCEMIA

O cálcio é o mais abundante elemento mineral do organismo animal (1-2%), estando 99% deste nos ossos e dentes, funcionando o primeiro como órgão estoque deste elemento. Além de representar mais de 20% do peso total dos ossos, o cálcio participa de outras várias funções como: contração muscular, controlando a liberação de trifosfato de adenosina (ATP) no sistema actina-miosina; passagem de estímulos nervosos e a passagem do impulso nervoso pela placa neuromuscular, através do aumento ou diminuição dos níveis de potássio e liberação da acetilcolina, respectivamente. Devido a grande importância da homeostase do Ca, seus valores plasmáticos normais são mantidos rigorosamente através de mecanismos de absorção e reabsorção (McDOWEL, 1999; ORTOLANI, 2006).

A calcemia é mantida através da absorção do cálcio pelos intestinos e pela reabsorção no órgão estoque (ossos). Ambos os processos de captação deste elemento são regulados por sofisticada reação em cascata, que se inicia com a liberação de paratormônio (PTH), produzido pela glândula tireóide. Este hormônio irá regular a velocidade de transformação, nos rins, da 2,5 hidroxivitamina D em 1,25 dihidroxivitamina D, metabólito muito mais potente que o anterior. Este metabólito irá regular, via aumento da síntese de RNA mensageiro, a produção de proteína carreadora de cálcio a ser absorvido pelos enterócitos. Além de atuar no aumento da atividade dos osteoclastos potencializando a reabsorção óssea. Antagônico a este

mecanismo, existe a calcitonina, hormônio hipocalcemiante que diminui a reabsorção renal do cálcio filtrado e aumenta a atividade osteoblástica de deposição óssea deste elemento (ORTOLANI, 1995).

Cerca de 10 a 20% do cálcio da dieta é absorvido, podendo esta eficiência ser influenciada por diversos fatores como a idade, quantidade ingerida, disponibilidade de vitamina D, calcitonina e paratormônio. Já a reabsorção renal do cálcio pode chegar a 99% do cálcio filtrado, sofrendo este mecanismo ação do paratormônio e da calcitonina, aumentado e diminuindo, respectivamente a capacidade reabsorvitiva renal. No sangue o cálcio encontra-se na forma não difusível ligado a proteínas, principalmente a albumina, e na forma difusível ou ionizável (47%) (PAULINO; BONDAN, 2006). Em eqüinos 50% do cálcio plasmático encontra-se na forma livre ou ionizável (KOHN, 1990).

No Período que antecede ao parto existe uma tendência para que as vacas apresentem certa dificuldade para manter a homeostase da calcemia, em particular a fração do cálcio ionizável. Tanto os níveis de absorção intestinal como reabsorção óssea estão diminuídos nos últimos sete dias antes e dois dias após o parto. Além disso, a demanda de cálcio está aumentada, pois o colostro produzido contém o dobro das quantidades de cálcio (2,3 g/L) que o leite comum (1,1 g/L). Torna-se essencial neste período que os mecanismos de reabsorção óssea estejam adequados para manter a calcemia. Caso isto não ocorra, o animal retira o cálcio da fração ionizável do sangue para produção do colostro ocasionando o quadro clínico de hipocalcemia (MELLAU et al., 2001).

A hipocalcemia da vaca parturiente é uma enfermidade cosmopolita, tendo incidência elevada nos países nórdicos (11%) e relativamente alta no Estado de São Paulo, Brasil (4,25%) (ORTOLANI, 1995). Recente trabalho realizado no Rio

Grandes do Sul mostra que esta enfermidade corresponde a 69,98% das doenças metabólicas diagnosticadas, causando perdas anuais bastante elevadas (ZIGUER et al., 2005).

O quadro clínico desta enfermidade é classicamente dividido em três fases. Na primeira delas, de curta duração e normalmente pouco presenciada pelo veterinário de campo, a consciência é mantida, o excitamento nervoso é notório, acompanhado de tremores de cabeça, tetania muscular e movimentação exagerada dos lábios e da língua. A rigidez dos membros posteriores e ataxia conferem ao animal a posição de cavalete e a queda é comum nesta fase. Na segunda fase a consciência se torna deprimida, as tetanias musculares desaparecem e dão lugar a paresia. O aspecto do animal é de sonolência e freqüentemente a atitude é de auto-auscultação, com permanência em decúbito esternal. A taquicardia e hipofonese são evidentes, sendo também observados pele e muflor secos, extremidades frias e atonia ruminal. Na terceira fase a perda da consciência é ampla e o quadro de coma se sobrepõe. A musculatura se torna flácida enquanto a taquicardia e hipofonese se intensificam. O pulso torna-se imperceptível e o meteorismo ruminal intenso pode preceder a morte (FENWICK; DANIEL, 1990; MELLAU et al., 2001; CESCO et al., 2004).

Valores de calcemia variando entre 0,45 mMol/L e 0,85 mMol/L, foram considerados responsáveis pela estase ruminal em bovinos induzidos hipocalcemia aguda com uso de solução de ácido etilenodiaminotetracético dissódico (EDTA). Na ordem cronológica do quadro clínico, a atonia ruminal ocorre já no início da primeira fase ou durante a transição dessa para a segunda. Este sintoma pode ser decisivo na causa da morte ao fim da terceira fase (FENWICK; DANIEL, 1990; CESCO et al., 2004).

Em eqüinos os sinais clínicos associados a hipocalcemia leve são atribuíveis a aumento na excitabilidade da membrana de tecido excitável, incluindo o coração e o músculo esquelético. Na hipocalcemia mais grave, a força da contração do músculo esquelético diminui, resultando em paralisia flácida (REED; BAYLY, 2000). Segundo estes autores, os sinais clínicos específicos observados vão diferir de acordo com a síndrome clínica. Entre as síndromes citam flutter diafragmático sincrônico, tetania hipocalcêmica e convulsões hipocalcêmicas.

O diagnóstico da hipocalcemia da vaca parturiente poder ser firmado através de dosagens do cálcio sérico total e ionizável, ou através do diagnóstico clínico da enfermidade seguido da resposta ao tratamento (RADOSTITS et al., 2007). Menores valores séricos de cálcio e fósforo foram observados nas vacas hipocalcêmicas (1,55 mMol/L e 1,04 mMol/L) quando comparadas com vacas híginas (2,2 mMol/L e 1,65 mMol/L), e o inverso acontecendo relação aos valores de magnésio (ORTOLANI, 1995). Valores normais e diminuídos de fósforo plasmático têm sido observados por vários autores em casos espontâneos e experimentais desta enfermidade (CESCO, 2006).

Tratamento realizado com quatro diferentes quantidades de aplicações intravenosas de cálcio (3, 4,5, 6, 7,5 e 9,0 g) em vacas diagnosticadas com hipocalcemia mostrou melhores resultados associados às maiores dosagens (ORTOLANI, 1995). Entretanto, em quadros de hipocalcemia aguda induzidos por meio da infusão intravenosa de EDTA, foi observado recuperação dos animais que foram tratados somente com solução fisiológica, o que dificilmente seria reproduzido em casos espontâneos desta enfermidade (CESCO, 2006).

USO DA INFUSÃO DE EDTA NA INDUÇÃO DA HIPOCALCEMIA AGUDA

Vários autores confirmam que a infusão contínua de EDTA queila especificamente o cálcio ionizável sendo bom modelo experimental para indução de quadros clínicos de hipocalcemia em ruminantes. Estes afirmam que a queda do cálcio plasmático ocorre de forma rápida numa primeira fase seguida de um platô e nova queda brusca. A primeira fase pode ser conseqüência do atraso na adaptação aos mecanismos homeostáticos, a segunda fase uma manifestação em resposta a liberação do PTH e a terceira como conseqüência da infusão prolongada do EDTA (FENWICK; DANIEL, 1990; DESMECHT et al., 1995; MELLAU et al., 2001; CESCO et al., 2004). Esta diminuição da calcemia pode atingir valores como 60% do cálcio ionizável, porém esta queda é mais acentuada em musculatura lisa e grandes massas musculares, havendo preservação inicial da calcemia no sistema cardiorrespiratório, sistema nervoso central e rins (RADOSTITS et al., 2007).

O magnésio é um cátion bivalente (Mg^{+2}) assim como o Cálcio (Ca^{+2}), encontra-se na forma ionizável no plasma e pode se ligar ao EDTA. Apesar do maior peso molecular do Ca que produz maior afinidade do EDTA por este íon, há controvérsias na literatura em relação a queda nos valores plasmáticos do magnésio em casos espontâneos e experimentais da hipocalcemia (CESCO, 2006)

O tempo médio de infusão de EDTA necessário para dar início a terceira fase do quadro de hipocalcemia variou de 97,8 a 163,4 minutos, em quatro grupos experimentais, mostrando variação individual no desenvolvimento dos sinais clínicos de hipocalcemia. Desta forma, a eficiência e a rapidez com que os mecanismos

homeostáticos respondem podem determinar a resistência do animal à indução da hipocalcemia (MELLAU et al., 2001).

Em eqüinos o uso de injeções de EDTA foi realizado buscando estudar o metabolismo do cálcio. Biópsias realizadas no osso frontal após o período experimental demonstraram aumento de atividade osteoblástica e osteoclástica, sugerindo um aumento de “turnover” ósseo (ARGENZIO et al., 1974). Outro estudo buscou avaliar o efeito do quadro de hipocalcemia induzida por injeções intravenosas de EDTA na condutibilidade de impulso elétrico muscular em eqüinos por meio de eletromiografias. Neste, os autores constataram hiperexcitabilidade nervosa advinda do quadro de hipocalcemia (WIJNBERG et al., 2002). Foi observado aumento similar nos valores de paratormônio sérico quando utilizaram infusões de pequenas quantidades de EDTA ou excesso de exercício na indução da hipocalcemia em eqüinos (AGUILERA et al., 1998).

Apesar da ampla literatura referente à hipocalcemia em bovinos, é válido ainda um experimento que avalie tanto a sintomatologia apresentada no quadro de hipocalcemia induzida em numero maior de animais, quanto à recuperação após o tratamento e os possíveis malefícios a saúde dos ruminantes. Em eqüinos os trabalhos de indução estão relacionados a quadros leves a moderados, ou ainda secundários a exercício físico ou a outras doenças intercorrentes (AGUILERA et al., 1998; TORIBIO et al., 2001; WIJNBERG et al., 2002). Os quadros graves ou agudos normalmente são descrições de casos espontâneos e isolados (RICHARDSON et al., 1991; SCARRATT et al., 1991; FERNANDES et al., 1995; BEYER et al., 1997; CHIACHIO et al., 2005), existindo ainda necessidade da reprodução experimental para melhor descrição da forma clínica e avaliação laboratorial desta enfermidade, bem como para validar o modelo experimental nessa espécie.

3 OBJETIVOS

Validar o modelo experimental de indução de hipocalcemia, por meio de solução de EDTA, utilizado em bovinos para a espécie eqüina, bem como avaliar o grau de reversão do quadro clínico pela infusão intravenosa de solução contendo cálcio, nas duas espécies animais.

Estudar o quadro sintomatológico e acompanhar algumas variáveis bioquímicas sangüíneas no decorrer do período de indução, tratamento e de recuperação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E ALIMENTAÇÃO

Foram utilizados 24 animais, sendo 12 fêmeas bovinas e 12 éguas, todas híbridas e não prenhes. As vacas eram da raça holandesa preta e branca, com peso variando entre 300 e 360 kg e idade entre dois a três anos, procedentes de um único rebanho do município de Pirassununga, Estado de São Paulo. As éguas eram mestiças e possuíam idade variando entre 6 e 8 anos e peso entre 400 e 600 kg, procedentes do rebanho eqüino da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Pirassununga.

Um mês antes do início do período experimental todos os animais receberam aplicação de endectocida a base de ivermectina¹ na concentração de 3,15%, na dose de 1 ml para cada 50 kg de peso vivo aplicada por via subcutânea e 10 ml por animal de polivitamínico mineral². Foi realizado ainda banho com carrapaticida a base de amitraz³ na dosagem recomendada pelo fabricante, e aplicação apenas nos bovinos de doses de vacina contra clostridioses⁴, seguida de reforço após 30 dias da primeira imunização.

Durante o período de adaptação e no decorrer do experimento os animais foram alimentados com uma ração total composta de 75% da matéria seca (MS) de feno de capim Coast-cross e 25% da MS de ração concentrada comercial, a qual foi

¹ Ivomec Gold® – Merial Saúde Animal®

² Modificador Orgânico® – Vallée®

³ Triatox® – Shering-Plough Saúde Animal®

⁴ Sintoxan polivalente T® – Merial Saúde Animal®

oferecida duas vezes ao dia. A quantidade de matéria seca da ração total ofertada aos animais foi calculada em relação a 2,7% do peso vivo (PV) individual. As constituições bromatológicas e a concentração de cálcio e fósforo da dieta encontram-se no quadro 1.

Composição	Concentrado Bovinos	Concentrado Eqüinos	Feno
Matéria seca (%)	88,0	87,0	87,4
Fibra bruta (%)	5,7	5,2	26,5
Proteína bruta (%)	17,4	15,0	7,3
Extrato etéreo (%)	5,8	4,1	2,1
Matéria mineral (%)	10,0	9,6	6,4
Cálcio (%)	1,4	1,1	0,4
Fósforo (%)	0,9	0,5	0,1

Quadro 1 - Composição bromatológica e mineral das dietas fornecidas aos bovinos e eqüinos - São Paulo - 2007

Foram colocados colares para identificação dos animais numerados de 1 a 24. Os animais receberam ainda cabrestos individuais apropriados para facilitação do manejo.

4.2 INSTALAÇÕES

O estudo clínico foi realizado nas dependências do Hospital Veterinário da FMVZ-USP, campus de Pirassununga, Estado de São Paulo. Tanto bovinos quanto eqüinos foram alocados em três piquetes de 200 m², permanecendo quatro animais em cada piquete. O experimento foi realizado em duas fases. Inicialmente realizaram-se as induções e tratamento nos bovinos e imediatamente após, o estudo foi repetido nas éguas.

4.3 DELINEAMENTO E PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Este experimento seguiu um delineamento experimental inteiramente ao acaso, onde os bovinos e eqüinos, isoladamente, foram sorteados em dois grupos compostos de cinco animais no grupo controle e sete no grupo tratado com cálcio.

O modelo de indução utilizado seguiu a o descrito por Smith e Brown (1963), onde foi injetado através de cateter intravenoso, na veia jugular externa, uma solução de ácido etilenodiaminotetracético dissódico (EDTA) a 5%, com pH ajustado para 7,4 utilizando-se para o tamponamento solução de hidróxido de sódio 0,1 N.

A infusão dessa solução de EDTA foi contínua e com velocidade controlada de 220 mL/hora, utilizando-se para isso uma bomba infusora marca DIGIBOMB®, até que o animal apresenta-se os sinais clínicos clássicos de hipocalcemia, ou seja:

decúbito esternal com atitude de auto-auscultação ou decúbito lateral. Nesse momento a infusão era imediatamente encerrada.

Quando do término da infusão, utilizando-se o mesmo cateter, o grupo tratado com Ca foi imediatamente medicado com uma solução, em desenvolvimento pelo Laboratório Vallée S.A., contendo 2,44 g de cálcio total oriundo de 3 fontes (Gluconato de Cálcio monoidratado, Lactato de Cálcio pentaidratado e D-Sacatato de Cálcio tetraidratado), 0,185 g magnésio, 0,472 g de fósforo (Hipofosfito de magnésio hexaidratado) e 5 g de Dextrose anidra para cada 100 mL, na dose de 1 mL/kg/PV. Essa infusão foi realizada lentamente, com uma duração média de 30 minutos, segundo recomendação do supracitado Laboratório. Nenhum outro medicamento foi utilizado na recuperação dos animais.

Após atingir o ponto em que a infusão de EDTA foi interrompida o grupo controle foi infundido com uma solução fisiológica de cloreto de sódio num período de 30 minutos na mesma velocidade utilizada para a solução de Ca. Após este período os animais do grupo controle foram, sem delongas, tratados com o mesmo produto e protocolo supracitado a fim de recuperá-los.

4.4 EXAME CLÍNICO DOS ANIMAIS

Um detalhado exame clínico foi realizado no decorrer das diferentes fases do experimento, dando-se ênfase para a determinação das funções vitais segundo recomendações de Feitosa (2004). Outros sinais clínicos foram devidamente observados e registrados. As seguintes variáveis foram analisadas no decorrer do

experimento: frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), movimentos ruminais (MR), movimentos cecais (MC), temperatura retal (TR) e tempo de preenchimento capilar (TPC).

Tais avaliações foram registradas nos seguintes momentos:

- **T0** - Tempo zero (basal, antes do início da infusão de EDTA)
- **T1** - Fase I da hipocalcemia, caracterizada por tremores musculares
- **T2** - Fase II da hipocalcemia, caracterizada por decúbito esternal com atitude de auto-auscultação ou decúbito lateral. Momento em que era interrompida a infusão de EDTA e iniciado o tratamento dos animais
- **T3** - Após o término do tratamento, 30 minutos após o término da infusão de EDTA.
- **T4** - 24 horas após o término do experimento.

No grupo controle, o tempo T3 foi avaliado 30 minutos após o término da infusão de EDTA, período em que os animais controle receberam 1 mL/Kg de peso vivo de solução fisiológica ao invés do tratamento com Ca. Nos eqüinos optou-se por não considerar o tempo T1 devido a inquietação dos animais, o que dificultou a colheita de amostras e a avaliação clínica.

4.5 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS SANGÜÍNEAS

Foram realizadas coletas de sangue em todos os animais nos mesmo tempos supracitados em que foi realizado o exame clínico. As amostras foram obtidas por meio de venipunctura da jugular externa, contralateral a cânula quando necessário, utilizando-se tubos de coleta a vácuo (vacutainer[®]) contendo ou não anticoagulante (EDTA ou Fluoreto de Sódio). Os tubos sem anticoagulante e com Fluoreto foram centrifugados a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos para obtenção de soro e plasma, respectivamente, que foram armazenados em tubos tipo eppendorf[®] com capacidade de 2 mL cada, em duas alíquotas para cada amostra, e congelados a menos 20 °C. As alíquotas de soro dos animais foram descongeladas em temperatura ambiente uma única vez para serem analisadas. As amostras de sangue total coletadas em tubo com EDTA foram utilizados para determinação do volume globular.

No soro sanguíneo foram realizados as determinações da proteína total, albumina, gama glutamiltransferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), creatina quinase (CK), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e fósforo (P) enquanto no plasma foi feita a determinação da glicose. O cálcio livre ou ionizável foi estimado utilizando-se a seguinte fórmula clássica, descrita por Brito (1998):

$$\text{Ca}^{++} \text{ mMol/L} = 6 \text{ Ca (total mMol/L)} - (\text{Proteína total/ 3})$$

$$\text{Proteína total} + 6$$

4.5.1 Determinação da concentração sérica de cálcio (Ca)

A concentração de cálcio no soro foi determinada no analisador bioquímico automático Liasys, marca AMS® e utilizando-se o kit comercial da marca BIOSYSTEMS®.

4.5.2 Determinação da concentração sérica de fósforo (P)

A concentração do fósforo sérico foi determinada no analisador bioquímico automático Liasys, marca AMS® e utilizando-se o kit comercial da marca BIOSYSTEMS®.

4.5.3 Determinação da concentração sérica de magnésio (Mg)

A concentração do magnésio sérico foi determinada no analisador bioquímico automático Liasys, marca AMS® e utilizando-se o kit comercial da marca BIOSYSTEMS®.

4.5.4 Determinação da concentração plasmática da glicose

A concentração plasmática de glicose foi determinada no analisador bioquímico automático Liasys, marca AMS[®], utilizando-se kit comercial SIGMA[®], seguindo a técnica enzimática descrita por Trinder (1969).

4.5.5 Determinação da concentração sérica de proteína total

A concentração sérica de proteína total foi determinada pelo método do biureto e processada no analisador bioquímico automático Liasys, marca AMS[®].

4.5.6 Determinação da concentração sérica de albumina

A concentração sérica de albumina foi determinada pelo método do verde bromocresol e processada no analisador bioquímico automático Liasys, marca AMS[®].

4.5.7 Determinação da atividade da aspartato aminotransferase (AST)

A concentração sérica da AST determinada no analisador bioquímico automático Liasys, marca AMS®, utilizando-se kit comercial BIOSYSTEMS®, seguindo a técnica enzimática descrita por Gella et al. (1985). Os resultados das atividades das enzimas foram determinados em 30 °C, segundo recomendação de Kaneko et al. (1997).

4.5.8 Determinação da atividade da gama glutamiltransferase (GGT)

A concentração sérica da GGT determinada no analisador bioquímico automático Liasys, marca AMS®, utilizando-se kit comercial BIOSYSTEMS®. Os resultados das atividades das enzimas foram determinados em 30 °C, segundo recomendação de Kaneko et al. (1997).

4.5.9 Determinação da atividade da creatina quinase (CK)

A atividade de CK foi determinada através de método cinético, utilizando kit comercial BIOSYSTEMS® nº 11524. As amostras foram processadas no analisador bioquímico automático marca AMS® modelo Liasys. Os resultados das atividades

das enzimas foram determinados em 30 °C, segundo recomendação de Kaneko et al. (1997).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra para cada um dos grupos seguiu as recomendações emitidas por Sampaio (2002) levando-se em consideração o intervalo de confiança da média obtida para os teores de cálcio sérico total em bovinos submetidos à indução de hipocalcemia no momento de decúbito esternal e atitude de auto-auscultação (no grupo tratado) em experimento semelhante realizado anteriormente por Cesco (2006), onde:

$$\text{Intervalo de confiança da média} = t s / \sqrt{r}$$

$$0,10 = 2 \times 0,24 / \sqrt{r}$$

$$\sqrt{r} = 0,48/0,10$$

$$\sqrt{r} = 4,8 \text{ animais/ grupo.}$$

T = valor tabelado para valores finitos

S = desvio padrão

$\sqrt{r}$ = número de animais a ser empregado no experimento

As análises estatísticas foram realizadas isoladamente para cada espécie. Fizeram-se análises intra-grupo, considerando o tempo zero como controle dentro

dos grupos tratado e controle; e a estatística entre grupos, comparando os dois grupos em cada um dos tempos avaliados.

Todos os dados foram testados quanto à sua distribuição, utilizando-se para tal o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados que tiveram distribuição normal foram submetidos inicialmente à análise de variância (teste F) e no caso de significância os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey (SAMPAIO, 2002). Análises de regressão e seus respectivos coeficientes de determinação foram utilizados para a verificação da relação de pares variáveis. Foi adotado neste trabalho um grau de significância mínimo de 5%. A maioria das análises estatísticas foi processada com o auxílio de software estatístico (MINITAB, 2000).

5 RESULTADOS

5.1 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

5.1.1 Quadro clínico dos bovinos

No decorrer da infusão foi constatado na maioria dos animais movimento cinético involuntário de língua, lambendo o muflo e a narina, estalido dos lábios, sucção de ar entre os dentes, protrusão de língua, diminuto grau de sialorréia e movimentos de mastigação meríssica. Nesse momento os animais se tornavam inquietos e desenvolveram rigidez dos membros posteriores. Embora fosse esperado o surgimento de tremores musculares tal sinal clínico surgiu apenas em alguns bovinos.

Em seguida, os animais apresentavam apatia, incoordenação motora e andar cambaleante, seguidos de decúbito esternal e por fim de decúbito lateral. A maioria das novilhas antes de permanecerem em decúbito lateral mantiveram atitude de auto-auscultação. Neste momento, o alimento usualmente oferecido foi recusado pelos animais. Com o aprofundar da infusão a depressão na consciência aumentou e as novilhas passaram a demonstrar estado de sonolência. A atonia ruminal neste estágio era marcante (Tabela 3), e muitas novilhas apresentaram quadro de meteorismo gasoso ruminal (timpanismo, “sic”). Neste estágio a constatação de anúria e ausência de defecação foram freqüentes.

A maioria dos animais apresentou quadro de midríase e perda de reflexo anal. A temperatura cutânea nas extremidades também estava aparentemente diminuída. A taquicardia foi evidente associada a quadro de hipofonese (Tabela 1).

Após o término da injeção de EDTA os animais do grupo controle, durante a infusão de solução fisiológica no decorrer de 30 minutos, continuaram a apresentar quadro de depressão no estado geral, apatia, falta de resposta aos estímulos tácteis e sonoros, midríase e perda de reflexo anal. Três das cinco novilhas se mantiveram em decúbito lateral.

Quadro de meteorismo gasoso leve foi evidenciado em algumas novilhas. Outros sinais clínicos observados com menor frequência foram: movimentos de pedalagem, mioclonia e trismo, acentuada dispnéia, seguida ou não de apnéia, e respiração ruidosa.

As tabelas 1 a 5 apresentam os resultados da frequência cardíaca, frequência respiratória, movimentos ruminais, temperatura retal e tempo de preenchimento capilar, respectivamente, nos diferentes tempos de avaliação clínica.

Os gráficos 1 a 5 ilustram o comportamento das variáveis clínicas frequência cardíaca, frequência respiratória, movimentos ruminais, temperatura retal e tempo de preenchimento capilar, respectivamente, no decorrer do experimento.

Tabela 1 - Valores médios e desvios padrão da frequência cardíaca (bat/min) dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Frequência Cardíaca				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	64,0 ^B	2,3	57,6 ^C	5,4	0,477
T 1	86,9 ^A	21,0	74,4 ^B	10,0	0,251
T 2	90,0 ^A	20,9	96,8 ^A	9,6	0,518
T 3	63,4 ^B	7,1	56,4 ^C	5,4	0,093
T 4	64,0 ^{B a}	2,3	59,6 ^{C b}	1,7	0,005
<i>P</i>	0,001		0,001		

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 1 - Valores médios da frequência cardíaca (bat/min) dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo – 2007

Tabela 2 - Valores médios e desvios padrão da frequência respiratória (mov/min) dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Frequência respiratória				P
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	30,3	6,1	36,0	4,0	0,097
T 1	33,7	13,5	35,2	14,8	0,860
T 2	36,3	15,2	43,2	20,1	0,510
T 3	29,1	6,4	39,6	13,6	0,102
T 4	31,1	4,3	35,2	3,4	0,110
P	0,687		0,828		

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 2 - Valores médios da frequência respiratória (mov/min) dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tabela 3 - Valores médios e desvios padrão dos movimentos ruminais (mov/3') dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Movimentos ruminais (mov/3')				P
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	2,6 ^{A a}	0,8	2,4 ^{A a}	0,6	0,685
T 1	0,4 ^{C a}	0,5	0,0 ^{B a}	0,0	0,108
T 2	0,0 ^{C a}	0,0	0,0 ^{B a}	0,0	-
T 3	1,4 ^{B a}	0,5	0,4 ^{B b}	0,5	0,009
T 4	2,9 ^{A a}	0,4	2,4 ^{A a}	0,4	0,599
P	0,001		0,001		

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 3 - Valores médios dos movimentos ruminais (mov/3') dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tabela 4 - Valores médios e desvios padrão da temperatura retal (°C) dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Temperatura retal (°C)				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	38,8	0,4	39,1	0,5	0,302
T 1	39,1	0,4	39,2	0,2	0,645
T 2	39,1	0,3	39,3	0,3	0,170
T 3	38,9	0,5	38,9	0,3	0,934
T 4	39,1	0,5	38,7	0,4	0,089
<i>P</i>	0,235		0,224		

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 4 - Valores médios da temperatura retal (°C) dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tabela 5 - Valores médios e desvios padrão do tempo de preenchimento capilar dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Tempo de Preenchimento Capilar				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	±DP	Média	±DP	
T 0	2,4 ^B	0,5	2,8 ^B	0,4	0,235
T 1	3,1 ^A	0,4	3,6 ^{AB}	0,9	0,248
T 2	3,0 ^{A b}	0,6	4,0 ^{A a}	0,7	0,022
T 3	2,6 ^{AB b}	0,5	4,0 ^{A a}	0,7	0,003
T 4	2,4 ^B	0,5	2,8 ^B	0,4	0,235
<i>P</i>	0,036		0,013		

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 5 - Valores médios do tempo de preenchimento capilar dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Dentre as tabelas e gráficos com as variáveis clínicas dos bovinos apresentados, destaca-se a taquicardia observada na fase II do quadro de hipocalcemia (T2), a elevação do tempo de preenchimento capilar e a marcante diminuição dos movimentos ruminais, chegando a completa atonia no tempo 2, sendo que os animais do grupo controle não retornaram a atividade ruminal mesmo após 30 minutos do final da administração de EDTA.

5.1.2 Quadro clínico dos eqüinos

Uma das primeiras constatações clínicas observadas em todos os eqüinos, após a infusão de EDTA, foram os movimentos involuntários e contínuos de lábios e língua. A primeira manifestação foi de bocejo, seguido de movimento cinético da língua no interior da cavidade bucal e movimentos de mastigação meríssica. No decorrer dessas manifestações os animais já apresentavam quadro de excitação, manifestado por locomoção incessante, rodando em torno do mourão aos quais os mesmos estavam presos.

Na maioria dos eqüinos observaram-se tremores musculares, que se iniciavam nos membros anteriores, na musculatura do triceps braquial, passando em seguida para a musculatura intercostal e progredindo para região pélvica, atingindo nesta área os grandes grupos musculares. Esse tremor, que tinha caráter mais fino, evoluiu para quadro de tetania mais acentuada seguido de grande inquietação e agitação. Nesse estágio os animais para permanecerem em estação e equilíbrio,

mantinham em abdução os membros anteriores e apresentavam atitude de cavalete enquanto não estavam em locomoção.

Após este período de incoordenação e andar cambaleante nove dos 12 animais entraram em decúbito lateral, enquanto que os demais permaneceram em decúbito esternal. Nesse momento foi testado o apetite o qual estava ausente.

Com o prosseguimento da infusão da solução de EDTA constatava-se uma mudança do estado mental dos animais, mudando de quadro de excitação para progressiva depressão da consciência, indicado pela sonolência e falta de resposta a estímulos sonoros e tácteis. O reflexo pupilar estava bastante comprometido. Chamava a atenção o marcante quadro de taquipnéia (Tabela 7), acompanhada de dispnéia e apnéias temporárias.

A atonia cecal neste estágio era marcante (Tabela 8), os animais apresentaram repleição abdominal e a percussão do ceco indicou o acúmulo de gás no seu interior; a constatação de anúria e ausência de defecação foi frequente. A temperatura cutânea nas extremidades também estava aparentemente diminuída. A taquicardia foi evidente associada a quadro de hipofonese (Tabela 6).

Após o término da injeção de EDTA os animais do grupo controle, durante a infusão de solução fisiológica no decorrer de 30 minutos, continuaram a apresentar quadro de depressão no estado geral, apatia, falta de resposta aos estímulos tácteis e sonoros e midríase. Outros sintomas observados com menor frequência foram: movimentos de pedalagem, mioclonia e presença de halo arroxeadado na região perialveolar dos dentes incisivos.

As tabelas 6 a 10 apresentam os resultados médios e a análise estatística intra e entre grupos das variáveis frequência cardíaca, frequência respiratória,

movimentos cecais, temperatura retal e tempo de preenchimento capilar, respectivamente, considerando apenas os eqüinos estudados.

Os gráficos 6 a 10 ilustram o comportamento das variáveis clínicas frequência cardíaca, frequência respiratória, movimentos cecais, temperatura retal e tempo de preenchimento capilar, respectivamente, considerando apenas os eqüinos estudados.

Tabela 6 - Valores médios e desvios padrão da frequência cardíaca (bat/min) dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Frequência Cardíaca				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	41,0 ^B	2,4	38,2 ^B	6,7	0,354
T 2	69,3 ^A	12,3	62,3 ^A	17,0	0,433
T 3	42,7 ^B	4,8	56,7 ^{AB}	21,4	0,149
T 4	41,3 ^B	3,5	43,3 ^B	6,0	0,498
<i>P</i>	0,001		0,029		

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 6 - Valores médios da frequência cardíaca (bat/min) dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tabela 7 - Valores médios e desvios padrão da frequência respiratória (mov/min) dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Frequência respiratória				P
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	21,3 ^B	3,3	21,3 ^B	9,0	0,959
T 2	40,0 ^A	13,1	36,7 ^A	12,2	0,659
T 3	22,3 ^B	7,2	30,3 ^{AB}	9,5	0,131
T 4	20,7 ^B	2,4	22,7 ^{AB}	8,2	0,578
P	0,001		0,047		

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 7 - Valores médios da frequência respiratória (mov/min) dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tabela 8 - Valores médios e desvios padrão dos movimentos cecais (mov/3') dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Movimentos cecais (mov/3')				P
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	2,5 ^A	1,0	2,6 ^A	0,8	0,765
T 2	0,0 ^B	0,0	0,0 ^B	0,0	-
T 3	2,0 ^{A a}	0,6	0,0 ^{B b}	0,0	0,001
T 4	2,5 ^A	0,5	2,8 ^A	0,7	0,401
P	0,001		0,001		

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 8 - Valores médios dos movimentos cecais (mov/3') dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tabela 9 - Valores médios e desvios padrão da temperatura retal (°C) dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Temperatura retal (°C)				P
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	37,6	0,3	37,5	0,6	0,860
T 2	37,8	0,4	37,9	0,7	0,877
T 3	37,7	0,6	37,4	0,7	0,399
T 4	37,6	0,3	36,2	2,6	0,214
P	0,745		0,222		

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 9 - Valores médios da temperatura retal (°C) dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tabela 10 - Valores médios e desvios padrão do tempo de preenchimento capilar dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Tempo de Preenchimento Capilar				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	2,0 ^C	0,0	2,0 ^B	0,0	-
T 2	5,0 ^A	0,7	3,8 ^A	1,1	0,055
T 3	3,2 ^B	0,4	4,2 ^A	1,1	0,059
T 4	2,7 ^{BC}	0,5	2,5 ^B	0,5	0,602
<i>P</i>	0,001		0,002		-

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 10 -Valores médios e desvios padrão do tempo de preenchimento capilar dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Dentre as tabelas e gráficos com as variáveis clínicas dos eqüinos apresentados, destaca-se a similaridade de comportamento aos bovinos submetidos ao mesmo protocolo de indução à hipocalcemia. Tal fato pôde ser verificado pela taquicardia observada no T2, pela elevação do tempo de preenchimento capilar, sendo esta inclusive mais acentuada que nos ruminantes, bem como a marcante diminuição dos movimentos cecais, onde os animais do grupo controle continuaram em atonia cecal mesmo após 30 minutos do final da administração de EDTA. Destaca-se ainda a elevação da frequência respiratória, não verificada nos bovinos.

5.2 VARIÁVEIS DO PERFIL BIOQUÍMICO SANGÜÍNEO

5.2.1 Perfil bioquímico dos bovinos

As tabelas 11 a 20 apresentam os valores médios e a análise estatística intra-grupos e entre grupos das variáveis bioquímicas: cálcio total, cálcio ionizável, magnésio, fósforo, proteína total, albumina, glicose plasmática, atividade da Aspartato aminotransferase, atividade da Gama glutamiltransferase e atividade da creatina quinase, respectivamente, considerando apenas os bovinos estudados.

Os gráficos 11 a 20 ilustram o comportamento das variáveis bioquímicas: cálcio total, cálcio ionizável, magnésio, fósforo, proteína total, albumina, glicose plasmática, atividade da Aspartato aminotransferase, atividade da Gama glutamiltransferase e atividade da creatina quinase, respectivamente.

Tabela 11 - Valores médios e desvios padrão do Cálcio sérico total dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Cálcio sérico total (mMol/L)				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	2,78 ^{B a}	0,23	2,71 ^{A a}	0,16	0,486
T 1	1,96 ^{C a}	0,24	1,64 ^{BC b}	0,19	0,008
T 2	1,90 ^{C a}	0,32	1,51 ^{C a}	0,18	0,069
T 3	4,14 ^{A a}	0,19	1,98 ^{B b}	0,27	0,001
T 4	2,86 ^{B a}	0,09	2,81 ^{A a}	0,10	0,345
<i>P</i>	0,001		0,001		

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 11 - Valores médios do Cálcio sérico total dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tabela 12 - Valores médios e desvios padrão do Cálcio ionizável dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Cálcio ionizável (mMol/L)				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	1,21 ^{B a}	0,07	1,18 ^{A a}	0,03	0,417
T 1	0,89 ^{C a}	0,10	0,70 ^{C b}	0,06	0,003
T 2	0,75 ^{C a}	0,08	0,62 ^{C b}	0,06	0,013
T 3	1,86 ^{A a}	0,07	0,84 ^{B b}	0,08	0,001
T 4	1,25 ^{B a}	0,04	1,23 ^{A a}	0,06	0,400
<i>P</i>	0,001		0,001		

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 12 - Valores médios do Cálcio ionizável dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tabela 13 - Valores médios e desvios padrão do Fósforo sérico dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Fósforo sérico (mMol/L)				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	2,47 ^{AB}	0,2	2,72 ^A	0,2	0,771
T 1	2,28 ^B	0,2	2,01 ^B	0,4	0,166
T 2	2,30 ^B	0,2	2,23 ^{AB}	0,3	0,640
T 3	2,37 ^{AB}	0,2	2,16 ^{AB}	0,2	0,151
T 4	2,65 ^A	0,2	2,40 ^{AB}	0,3	0,115
<i>P</i>	0,012		0,012		

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 13 - Valores médios do Fósforo sérico dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tabela 14 - Valores médios e desvios padrão do Magnésio sérico dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Magnésio sérico (mMol/L)				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	0,87 ^{AB}	0,08	0,91 ^A	0,12	0,632
T 1	0,79 ^{AB}	0,30	0,75 ^{AB}	0,15	0,433
T 2	0,73 ^B	0,16	0,65 ^B	0,19	0,452
T 3	0,95 ^A	0,08	0,86 ^{AB}	0,16	0,211
T 4	0,86 ^{AB}	0,10	0,90 ^A	0,08	0,531
<i>P</i>	0,001		0,048		

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 14 - Valores médios do Magnésio sérico dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tabela 15 –Valores médios e desvios padrão de Proteína total sérica dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Proteína total sérica (g/dL)				P
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	±DP	Média	±DP	
T 0	7,29	0,53	7,24	0,66	0,896
T 1	7,27	0,62	7,23	0,76	0,935
T 2	7,52	0,69	7,54	1,01	0,971
T 3	7,06	0,44	7,32	0,97	0,543
T 4	7,22	0,38	7,27	0,36	0,834
P	0,638		0,971		

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 15 -Valores médios de Proteína total sérica dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tabela 16 –Valores médios e desvios padrão de Albumina sérica (g/dL) dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Albumina sérica (g/dL)				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	±DP	Média	±DP	
T 0	3,02	0,13	3,02	0,39	0,974
T 1	3,05	0,24	3,06	0,45	0,943
T 2	3,11	0,27	3,15	0,55	0,893
T 3	2,93	0,15	3,05	0,45	0,532
T 4	3,01	0,13	3,03	0,17	0,819
<i>P</i>	0,519		0,990		

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 16 -Valores médios de Albumina sérica dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tabela 17 - Valores médios e desvios padrão da Glicose plasmática dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Glicose plasmática (mMol/L)				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	3,7 ^B	0,4	3,6 ^B	0,3	0,852
T 1	3,7 ^B	0,2	3,7 ^B	0,4	0,789
T 2	4,1 ^B	0,3	4,4 ^{AB}	0,5	0,317
T 3	5,2 ^A	0,4	4,8 ^A	0,9	0,286
T 4	3,9 ^B	0,2	4,0 ^{AB}	0,3	0,172
<i>P</i>	0,001		0,023		

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 17 - Valores médios de Glicose plasmática dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tabela 18 –Valores médios e desvios padrão da atividade da aspartato aminotransferase (U/L) a 30 °C dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Aspartato aminotransferase (U/L)				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	50,2 ^B	5,3	51,7	15,5	0,807
T 1	52,6 ^B	8,5	57,3	20,9	0,629
T 2	60,9 ^{AB}	21,6	61,7	24,7	0,958
T 3	52,6 ^B	6,1	62,0	25,9	0,370
T 4	85,1 ^A	31,4	78,0	27,9	0,696
<i>P</i>	0,006		0,496		

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 18 -Valores médios de atividade da aspartato aminotransferase dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tabela 19 –Valores médios e desvios padrão da atividade da gama glutamiltransferase (U/L) a 30 °C dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Gama glutamiltransferase (U/L)				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	21,3	4,3	18,5	3,3	0,331
T 1	20,9	6,5	17,6	2,8	0,359
T 2	20,6	5,9	18,4	3,2	0,462
T 3	20,5	5,0	17,9	3,7	0,221
T 4	21,5	5,2	18,8	2,5	0,315
<i>P</i>	0,996		0,957		

Nota: Não houve diferença significativa entre as médias obtidas.

Gráfico 19 -Valores médios de atividade da gama glutamiltransferase dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tabela 20 –Valores médios e desvios padrão da atividade da creatina quinase sérica (U/L) a 30 °C dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Creatina quinase (U/L)				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	105,8	59,2	151,8	110,8	0,371
T 1	177,5	104,8	161,1	99,4	0,798
T 2	192,2	119,4	292,9	227,5	0,338
T 3	229,8	120,0	424,3	308,8	0,156
T 4	363,4	507,7	411,8	247,6	0,849
<i>P</i>	0,416		0,157		

Nota: Não houve diferença significativa entre as médias obtidas.

Gráfico 20 -Valores médios de atividade da creatina quinase sérica dos bovinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

5.2.4 Variáveis bioquímicas eqüinos

As tabelas 21 a 30 apresentam os valores médios e a análise estatística intra grupos e entre grupos das variáveis bioquímicas cálcio total, cálcio ionizável, magnésio, fósforo, proteína total, albumina, glicose plasmática, atividade da Aspartato aminotransferase, atividade da Gama glutamiltransferase e atividade da creatina quinase, respectivamente, considerando apenas os eqüinos estudados.

Os gráficos 21 a 30 ilustram o comportamento das variáveis bioquímicas: cálcio total, cálcio ionizável, magnésio, fósforo, proteína sérica total, albumina sérica, glicose plasmática, atividade da Aspartato aminotransferase, atividade da Gama glutamiltransferase e atividade da creatina quinase, respectivamente.

Tabela 21 - Valores médios e desvios padrão do Cálcio sérico total dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo – 2007

Tempos	Cálcio sérico total (mMol/L)				P
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	2,93 ^B	0,15	3,27 ^A	0,50	0,121
T 2	1,50 ^C	0,26	1,62 ^C	0,12	0,341
T 3	4,57 ^{A a}	0,34	2,03 ^{B b}	0,10	0,001
T 4	3,32 ^B	0,24	3,33 ^A	0,08	0,756
P	0,001		0,001		

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 21 - Valores médios do Cálcio sérico total dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo – 2007

Tabela 22 - Valores médios e desvios padrão do Cálcio ionizável dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo – 2007

Tempos	Cálcio ionizável (mMol/L)				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	1,32 ^B	0,17	1,47 ^A	0,16	0,321
T 2	0,62 ^C	0,13	0,68 ^C	0,03	0,363
T 3	2,12 ^{A a}	0,13	0,86 ^{B b}	0,03	0,001
T 4	1,51 ^B	0,03	1,52 ^A	0,06	0,706
<i>P</i>	0,001		0,001		

Nota: Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 22 - Valores médios do Cálcio ionizável dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo – 2007

Tabela 23 - Valores médios e desvios padrão do Fósforo sérico dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo – 2007

Tempos	Fósforo (mMol/L)				P
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	1,83	0,45	1,58 ^{AB}	0,40	0,329
T 2	2,13	0,54	1,92 ^B	0,24	0,390
T 3	1,93	0,40	1,80 ^B	0,28	0,522
T 4	1,37	0,46	1,25 ^A	0,26	0,602
P	0,065		0,006		

Nota: Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 23 - Valores médios do Fósforo sérico dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo – 2007

Tabela 24 - Valores médios e desvios padrão do Magnésio sérico dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo – 2007

Tempos	Magnésio sérico (mMol/L)				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	0,90 ^A	0,11	0,88 ^A	0,05	0,752
T 2	0,52 ^B	0,31	0,47 ^C	0,06	0,716
T 3	0,98 ^{A a}	0,06	0,71 ^{B b}	0,06	0,001
T 4	0,91 ^A	0,07	0,87 ^A	0,07	0,376
<i>P</i>	0,001		0,001		

Nota: Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 24 - Valores médios do Magnésio sérico dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo – 2007

Tabela 25 –Valores médios e desvios padrão de Proteína total sérica dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo – 2007

Tempos	Proteína total sérica (g/dL)				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	±DP	Média	±DP	
T 0	6,88	0,21	6,91	0,45	0,878
T 2	7,41	0,45	7,30	0,53	0,686
T 3	6,72	0,39	7,36	0,68	0,073
T 4	6,83	0,16	6,80	0,46	0,908
<i>P</i>	0,111		0,222		

Nota: Não houve diferença significativa entre as médias obtidas.

Gráfico 25 -Valores médios de Proteína total sérica dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo – 2007

Tabela 26 – Valores médios e desvios padrão de Albumina sérica (g/dL) dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo – 2007

Tempos	Albumina sérica (g/dL)				P
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	±DP	Média	±DP	
T 0	3,24	0,12	3,24	0,19	0,957
T 2	3,49	0,22	3,47	0,24	0,893
T 3	3,19	0,21	3,41	0,28	0,162
T 4	3,18	0,13	3,24	0,23	0,595
P	0,083		0,261		

Nota: Não houve diferença significativa entre as médias obtidas.

Gráfico 26 - Valores médios de Albumina sérica dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo – 2007

Tabela 27 - Valores médios e desvios padrão da Glicose plasmática dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo – 2007

Tempos	Glicose plasmática (mMol/L)				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	5,0 ^A	0,5	4,9 ^B	0,9	0,775
T 2	8,2 ^A	2,9	7,2 ^{AB}	2,0	0,493
T 3	10,5 ^B	2,9	8,5 ^{AB}	2,2	0,488
T 4	5,2 ^A	0,6	5,9 ^B	1,3	0,244
<i>P</i>	0,001		0,008		

Nota: Letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos.

Gráfico 27 -Valores médios de Glicose plasmática dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo – 2007

Tabela 28 –Valores médios e desvios padrão da atividade da aspartato aminotransferase (U/L) a 30 °C dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Aspartato aminotransferase (U/L)				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	269,9	33,4	247,0	33,8	0,265
T 2	299,5	31,7	274,2	29,1	0,180
T 3	260,4	39,0	275,9	30,7	0,463
T 4	320,6	44,1	293,5	57,6	0,381
<i>P</i>					

Nota: Não houve diferença significativa entre as médias obtidas.

Gráfico 28 -Valores médios de atividade da aspartato aminotransferase dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo – 2007

Tabela 29 –Valores médios e desvios padrão da atividade da gama glutamiltransferase (U/L) a 30 °C dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Gama glutamiltransferase (U/L)				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	12,0	3,2	13,4	6,6	0,652
T 2	12,7	3,8	13,8	6,9	0,724
T 3	10,5	3,1	13,8	6,7	0,303
T 4	12,3	3,2	9,3	3,7	0,166
<i>P</i>	0,827		0,519		

Nota: Não houve diferença significativa entre as médias obtidas.

Gráfico 29 -Valores médios de atividade da gama glutamiltransferase dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tabela 30 –Valores médios e desvios padrão da atividade da creatina quinase sérica (U/L) a 30 °C dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo - 2007

Tempos	Creatina quinase (U/L)				<i>P</i>
	Grupo Tratamento		Grupo Controle		
	Média	± DP	Média	± DP	
T 0	204,6	67,9	169,3	25,1	0,260
T 2	245,7	66,6	209,0	96,7	0,462
T 3	263,2	56,5	251,0	136,6	0,843
T 4	523,6	456,6	570,6	543,7	0,874
<i>P</i>	0,105		0,090		

Nota: Não houve diferença significativa entre as médias obtidas.

Gráfico 30 -Valores médios de atividade da creatina quinase sérica dos eqüinos dos grupos tratado e controle nos diferentes tempos - São Paulo – 2007

6 DISCUSSÃO

O quadro clínico de hipocalcemia induzido pelo EDTA provocou sintomatologia clássica nas novilhas de ambos os grupos (tratado e controle), com o surgimento de duas das três principais fases da enfermidade, ou seja: de excitabilidade e tremores musculares (Fase I); depressão do estado geral, paresia muscular, decúbito esternal e atitude de auto-auscultação (Fase II). Alguns animais também chegaram a manifestar sintomas da terceira e derradeira fase com decúbito lateral, intenso quadro de depressão e marcante taquicardia (mais de 100 batimentos por minuto) e hipofonese.

A patogenia destes principais sintomas descritos acima esta intimamente ligada a intensidade da hipocalcemia presente no momento da indução (HERDT, 1988; RADOSTITS et al., 2007). A ligeira hipocalcemia inicial desencadeia um quadro de excitação, tetania, com a manutenção da consciência e com o animal ainda em estação. Com a intensificação da hipocalcemia surge a diminuição da força de contração da musculatura cardíaca, levando a concomitante menor eficiência do débito cardíaco. Tal situação desencadeia uma resposta animal de compensação por meio do aumento de frequência cardíaca (taquicardia), embora esta esteja acompanhada de hipofonese.

A diminuição da pressão arterial faz com que a temperatura cutânea das extremidades esteja reduzida e ocorra aumento no tempo de preenchimento capilar, em especial verificado no grupo controle após trinta minutos de infusão de solução salina (T3). A anúria é reflexo da menor perfusão renal e da menor contratibilidade da musculatura lisa vesical. Inadequada perfusão sangüínea também pode gerar

aumento na perda de consciência. A diminuição nos movimentos ruminais e surgimento de meteorismo gasoso ruminal, ausência de defecação e reflexo anal, e midríase são decorrentes da menor contratilidade da musculatura lisa do rúmen, da menor motilidade intestinal e das musculaturas estriadas dos anus e do músculo retrator da pupila, respectivamente. O mesmo ocorre com a musculatura esquelética estriada, a qual na fase I se mostra hipercontrátil e na fase seguinte parética ou até em paralisia, levando os animais a permanecerem em decúbito esternal ou lateral.

Merece ser citado a presença dos movimentos involuntários da língua e dos lábios. Tais sintomas não são encontrados em quadros clássicos de hipocalcemia natural e são considerados efeitos colaterais provocados pelo EDTA (FENWICK; DANIEL, 1990).

A sintomatologia definitiva de hipocalcemia foi gradativamente desaparecendo no decorrer do tratamento com a solução contendo cálcio. Chamou à atenção a diminuição da taquicardia, voltando à frequência dos batimentos cardíacos do tempo basal, já no início do tratamento. Nesse mesmo período também deixou de ser detectada a hipofonese característica. Outro fato marcante foi a mudança de atitude dos animais, os quais se mostraram bem mais alertas e conscientes. Das 12 fêmeas tratadas cinco delas se levantaram antes do término do tratamento e as demais em decúbito o fizeram dentro de no máximo 30 minutos após o término da terapia. Concomitantemente, a movimentação ruminal foi restabelecida, assim como o apetite voltou a estar presente após o tratamento em todos os animais. Com o fim da atonia ruminal o meteorismo gasoso também desapareceu, por meio de intensa eructação. A ausência de reflexos pupilar e anal foi completamente revertida.

Sem qualquer dúvida o EDTA gerou nas novilhas uma diminuição temporária da concentração sérica de cálcio total e cálcio livre ou ionizável (Tabelas 11 e 12 e

gráficos 11 e 12). Essa diminuição foi detectada, em relação ao momento basal, já quando os animais apresentavam os primeiros sintomas de hipocalcemia (T1). Entretanto, os teores de cálcio total e ionizável se elevaram de forma significativa após o término do tratamento, sendo inclusive mais elevados do que os valores observados no tempo basal.

Em bovinos hígidos cerca de metade do cálcio sérico se apresenta na forma ionizável e a outra remanescente ligada às proteínas séricas. O EDTA após ser infundido no sangue vai aos poucos trocando seus dois cátions (Na^+) por dois átomos de cálcio ionizável, formando com esse elemento uma forte ligação, tornando-o indisponível para o organismo (MELLAU et al., 2001). A velocidade com que o cálcio ionizável declinou foi semelhante a descrita por Mellau et al. (2001) em vacas, ou seja, teve queda contínua e prolongada até o final da infusão. Por outro lado, o tratamento com a solução a base de cálcio elevou de forma rápida e significativa o cálcio livre e total disponibilizando este elemento para o organismo e revertendo os sintomas de hipocalcemia.

Os teores de fósforo inorgânico dos ruminantes apresentaram discretas, mas significativas, diminuições no decorrer da infusão de EDTA, fato este revertido com o início do tratamento dos animais, o que provocou aumento significativo dos teores desse mineral (Tabela 13). Em casos naturais de hipocalcemia da vaca leiteira existe queda natural dos teores de fósforo inorgânico sérico, que pode ser mais intensa que o apresentado experimentalmente (ORTOLANI, 1995).

Os teores de magnésio aparentemente não se alteraram no decorrer da infusão de EDTA em relação ao tempo basal (Tabela 14). Tais achados também foram encontrados por Mellau et al. (2001). Este fato está associado à baixa afinidade do EDTA se ligar ao magnésio. Contudo mesmo sem diferença

significativa, percebe-se tendência de redução do Mg sérico, especialmente na fase II da hipocalcemia (T2). O tratamento dos animais elevou significativamente os teores de magnésio sérico, que retornaram aos valores basais 24 horas depois de iniciado o experimento.

As concentrações de proteína total (Tabela 15) e de albumina sérica (Tabela 16) dos bovinos não se alteraram durante o ensaio clínico.

Nos bovinos a glicemia aparentemente pouco se alterou durante a infusão de EDTA (Tabela 17). Destaca-se uma tendência de elevação na fase II da hipocalcemia, bem como um aumento significativo no T3 do grupo tratado, devido a solução de cálcio usada no tratamento dos animais conter também glicose. Observou-se também que a elevada glicemia do T2 manteve-se durante a infusão de solução fisiológica nos animais do grupo controle, apresentando valores elevados no T3.

Até onde se conhece o EDTA não interfere no metabolismo da glicose, porém o estresse da manipulação e principalmente a excitação verificada no primeiro estágio clínico dos animais deve ter provocado uma liberação de cortisol, o qual estimula a gliconeogênese com rápida liberação de glicose (SMITH; BROWN, 1963). A glicemia foi plenamente restabelecida 24 horas após a realização do experimento.

As atividades de GGT dos bovinos (Tabela 19 e gráfico 19) não se modificaram no decorrer do ensaio, indicando que não existiram lesões hepáticas decorrentes da indução com EDTA ou tratamento da hipocalcemia. Por outro lado, a atividade de AST (Tabela 18 e gráfico 18) se elevou ao término de 24 horas no grupo tratado, em relação aos outros tempos, fato que não ocorreu no grupo controle, provavelmente devido aos elevados desvios padrão observados, pois verificou-se elevação numérica da atividade desta enzima neste tempo. Mesmo

assim, na 24^a hora essa atividade foi semelhante entre o grupo tratado e controle. Tal elevação da atividade de AST está muito mais ligada às alterações musculares provavelmente oriundas de pequenas lesões desenvolvidas durante o decúbito patológico ou mesmo aos tremores musculares. Este fato pode ser constatado pela elevação numérica, mas não significativa, da atividade da creatina quinase (Tabela 20 e gráfico 20), que apresentou valores acima dos considerados normais para a espécie (KANEKO et al., 1997), sendo a elevação desta última enzima indicativa das supracitadas lesões musculares.

Nos eqüinos o modelo de indução experimental apresentou resultado satisfatório, provocando sintomatologia clássica em ambos os grupos, semelhante ao descrito em casos clínicos em eqüinos e o quadro experimental em ruminantes, com o surgimento de duas das três principais fases da enfermidade, ou seja: de excitabilidade e tremores musculares (Fase I); depressão do estado geral, paresia muscular e decúbito (Fase II). Alguns animais também chegaram a manifestar sintomas da terceira e derradeira fase com decúbito lateral, intenso quadro de depressão e marcante taquicardia (mais do que 70 batimentos por minuto) e hipofonese.

A patogenia destes principais sintomas descritos acima está intimamente ligado a intensidade da hipocalcemia presente no momento da indução (HERDT, 1988; RADOSTITS et al., 2007). A ligeira hipocalcemia inicial desencadeia quadro de excitação, tetania, com a manutenção da consciência e com o animal ainda em estação. Com a intensificação da hipocalcemia surge a diminuição da força de contração da musculatura cardíaca, levando a uma concomitante menor eficiência do débito cardíaco. Tal situação desencadeia uma resposta animal de compensação por meio do aumento de frequência cardíaca (taquicardia), embora esta esteja

acompanhada de hipofonese. A diminuição da pressão arterial faz com que a temperatura cutânea das extremidades esteja reduzida. A anúria é um reflexo da menor perfusão renal e da menor contratibilidade da musculatura lisa vesical. A inadequada perfusão sangüínea também pode gerar um aumento na perda de consciência.

A diminuição nos movimentos de ceco e surgimento de meteorismo gasoso neste órgão, ausência de defecação e midríase são decorrentes da menor contratibilidade da musculatura lisa do ceco, da menor motilidade intestinal e do músculo retrator da pupila, respectivamente. O mesmo ocorre com a musculatura esquelética estriada, a qual na fase I se mostra hipercontrátil e na fase seguinte parética ou até em paralisia, levando os animais a permanecerem em decúbito lateral ou esternal (FENWICK; DANIEL, 1990).

Merece ser citado a presença dos movimentos involuntários da língua e dos lábios. Tais sintomas não são encontrados em quadros clássicos de hipocalcemia natural em eqüinos e em bovinos são considerados efeitos colaterais provocados pelo EDTA (FERNANDES et al., 1995; WIJBERG et al., 2002; CHIACHIO et al., 2005).

A sintomatologia definitiva de hipocalcemia foi gradativamente desaparecendo no decorrer do tratamento com a supracitada solução. Chamou à atenção a diminuição da taquicardia, voltando à frequência dos batimentos cardíacos do tempo basal, já nos primeiros 15 minutos de tratamento. Nesse mesmo período também deixou de ser detectada a hipofonese característica. Outro fato marcante foi a mudança de atitude dos animais, os quais se mostraram bem mais alertas e conscientes. Das 12 fêmeas tratadas duas delas se levantaram ao redor do 15º minuto de tratamento e as demais em decúbito o fizeram imediatamente após o

término da terapia, com ou sem estímulo. Concomitantemente, a movimentação cecal foi restabelecida, assim como o apetite voltou a estar presente no decorrer do tratamento em todos os animais. Com o fim da atonia cecal o meteorismo no órgão desapareceu, por meio de maior grau de flatulência. A ausência de reflexos pupilar foi completamente revertida.

A infusão de EDTA provocou nas éguas diminuição temporária da concentração sérica de cálcio total e cálcio livre ou ionizável (Tabela 21 e 22 e gráficos 21 e 22). Essa diminuição no momento em que se instalou a fase II da hipocalcemia foi altamente significativa em relação ao momento basal, contudo, após o final do tratamento, os teores desse mineral se elevaram a patamares muito superiores aos demais tempos.

Em eqüinos hígidos cerca de metade do cálcio sérico se apresenta na forma ionizável e a outra remanescente ligada às proteínas séricas, semelhante ao que acontece em bovinos. O EDTA após ser infundido no sangue vai aos poucos trocando seus dois cátions (Na^+) por dois átomos de cálcio ionizável, formando com esse elemento forte ligação, tornando-o indisponível elemento para o organismo (MELLAU et al., 2001). A velocidade com que o cálcio ionizável declinou em eqüinos foi semelhante a descrita por Mellau et al. (2001) em vacas, ou seja, teve queda contínua e prolongada até o final da infusão. Por outro lado, o tratamento com cálcio aumentou de forma rápida e significativa o cálcio livre e total disponibilizando este elemento para o organismo e revertendo os sintomas de hipocalcemia.

Os teores de fósforo inorgânico apresentaram discretas elevações, significativas no grupo controle, no decorrer da infusão de EDTA (Tabela 23 e gráfico 23). Essa elevação dos teores de fósforo pode ser parcialmente explicada pelo tremor muscular exagerado que ocorreu em alguns animais. Segundo Mellau et al.

(2001) esse aumento de atividade muscular demanda consumo de energia, com transformação de ATP em ADP e liberação de fosfato na corrente circulatória. Em casos naturais de hipocalcemia da vaca leiteira existe uma queda natural dos teores de fósforo inorgânico sérico, antagônico ao observado neste ensaio com eqüinos (ORTOLANI, 1995).

Os teores de magnésio sérico das éguas foram significativamente diminuídos no decorrer da infusão de EDTA, mas essa concentração foi devidamente normalizada após o tratamento dos animais. Apesar de ter havido elevação entre os tempos 2 e 3 no grupo controle, esta não foi suficiente para igualar o Mg sérico aos valores basais, havendo no T3 diferença significativa entre os grupos tratado e controle. Cesco et al. (2004) detectaram ligeira diminuição, não significativa, nos teores de magnésio após a infusão de EDTA em vacas. É possível que o EDTA tenha maior poder de quelação do magnésio em eqüinos que em bovinos. Contudo, tal hipótese necessita ser mais estudada.

As concentrações de proteína total (Tabela 25 e gráfico 25) e de albumina sérica (Tabela 26 e gráfico 26) tenderam a se elevar durante a infusão de EDTA, se comparadas com o tempo basal. Até onde se conhece o EDTA não tem influência imediata na síntese de proteína e nem no grau de proteólise. Essa elevação pode ter ocorrido provavelmente pela excitação constatada durante a fase 1 da hipocalcemia, que deve ter causado uma contração esplênica, promovendo uma hemoconcentração, elevando a quantidade de elementos figurados no sangue e diminuindo a porcentagem de fluidos nesse meio, fazendo com que indiretamente provocasse aumento na concentração de proteína e de albumina.

A glicemia aumentou significativamente nos eqüinos durante a infusão de EDTA (Tabela 27 e gráfico 27). Aparentemente o EDTA não interfere no

metabolismo da glicose, porém o estresse da manipulação e principalmente a excitação verificada no primeiro estágio clínico dos animais deve ter provocado uma liberação de cortisol, o qual estimula a gliconeogênese com rápida liberação de glicose para a corrente circulatória. O tratamento com a solução de cálcio, que contém glicose, manteve a hiperglicemia anteriormente verificada em bovinos, restabelecendo-se a normalidade glicêmica após 24 da indução.

Tanto as atividades da GGT (Tabela 29 e gráfico 29) quanto as da AST (Tabela 28 e gráfico 28) nos eqüinos não se modificaram no decorrer do ensaio, indicando que não existiram lesões hepáticas decorrentes da indução com EDTA ou tratamento da hipocalcemia. Entretanto foi observada tendência de elevação, apenas nos valores da AST ao término de 24 horas em ambos os grupos, em relação aos demais tempos. Tal elevação da atividade de AST está muito mais ligada às alterações musculares provavelmente oriundas de pequenas lesões desenvolvidas durante o decúbito patológico ou mesmo causadas pelos tremores musculares. Idêntico e até mesmo mais destacado comportamento ocorreu com a creatina quinase (CK), que tendeu se elevar na 24^a hora (Tabela 30 e gráfico 30). A elevação de CK é uma enzima indicativa de lesão muscular, tal qual o AST.

7 CONCLUSÕES

O modelo experimental de indução de hipocalcemia usado classicamente em bovinos foi bastante eficiente para desenvolver quadro clínico característico desta enfermidade em eqüinos, podendo ser utilizado para estudos nesta espécie.

A solução rica em cálcio foi eficaz na recuperação do quadro de hipocalcemia, dentro de 30 minutos em ambas as espécies, sem apresentar posteriormente recidivas deste quadro.

Foi constatada durante a infusão de EDTA significativa queda nos teores séricos de cálcio total e ionizável e magnésio em ambas as espécies, bem como discreta diminuição das concentrações de fósforo nos bovinos e aumento destas nos eqüinos. Após o tratamento com solução rica em cálcio a calcemia se elevou acima dos valores basais temporariamente, retornando aos teores normais 24 horas após o tratamento.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA, T.; ESCOLÁSTICO, R.; GARFIA, B.; ESTEPA, J. C.; LOPEZ, I.; MAYER-VALOR, R.; RODRIGUEZ, M. Effects of exercise and EDTA administration on blood ionized calcium and parathyroid hormone in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 12, p. 1605-1607, 1998.
- ARGENZIO, R. A.; LOWE, J. E.; HINTZ, H. F.; SCHRYVER, F. Calcium and Phosphorus Homeostasis in Horses. **Journal of Nutrition**, v. 104, p. 18-27, 1974
- BEYER, M. J.; FREESTONE, J. F.; REIMER, M.; BERNARD, W. V.; RUEVE, E. R. Idiopathic hypocalcemia in foals. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 11, n. 6, p. 356-360, 1997.
- BRITO, L. A. B. **Avaliação do uso intensivo de cama de frango na alimentação de bovinos: alguns aspectos toxicológicos e do metabolismo do nitrogênio**. 1998. 235 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- CESCO, F. T. R. S. **Efeito terapêutico da Naloxona e do borogluconato de cálcio na reversão da hipocalcemia experimental em vacas**. 2006. 82 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- CESCO, F. T. R. S.; FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L.; MARTINS FILHO, L. P. Contribuição ao modelo experimental de hipocalcemia em vacas induzida pela infusão intravenosa de Na²EDTA. **ARS Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 180-184, 2004.
- CHIACHIO, S. B.; YONEZAWA, L. A.; AMORIM, R. M.; GONÇALVES, R. C.; TEIXEIRA, R. B. C.; FERREIRA, D. O. L. Hipocalcemia em pônei gestante: relato de caso; In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA - CONBRAVET, 32., 2005. **Anais...** Uberlândia, 2005, Meio digital.

DESMECHT, D. J. M.; LINDEN, A. S.; GODEAU, J. M.; LEKEUX, P. M. Experimental production of hypocalcemia by EDTA infusion in calves: a critical appraisal assessed from the profile of blood chemicals and enzymes. **Comparative Biochemical Physiology**, v. 110, n. 2, p.115-30, 1995.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico**. 1. ed. São Paulo: Rocca, 2004. 824p.

FENWICK, D. C.; DANIEL, R. C. W. A comparison between the main clinical signs of milk fever in cows with those of hypocalcaemia induced by Na₂EDTA solution. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 37, p. 721-728, 1990.

FERNANDES, W. R.; SILVA, L. C. L. C.; SILVA, S. L. E. Hipocalcemia em égua: relato de caso. In: CONGRESSO PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 3., 1995. **Anais...** São Paulo, 1995. p. 21-21.

GELLA, F. J.; OLIVEIRA, T.; CRUZ PASTOS, M.; ARENAS, J.; MORENO, O. R.; DURBAN, R.; GOMEZ, J. A. A simple procedure for routine determination of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase with piridoxal phosphate. **Clinical Chemistry Acta**, v. 157, n. 1, p. 241-247, 1985.

HERDT, T. H. Metabolic diseases of ruminant livestock . **The Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice**. v. 4, n. 2, p. 410-437, 1988

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

KOHN, C. W. Failure of pH to predict ionized calcium percentage in healthy horses. **American Journal Veterinary Research**, v. 51, n. 3, p. 1206-17, 1990.

McDOWELL, L.R. **Minerais para ruminantes sob pastejo em regiões tropicais, enfatizando o Brasil**. 3. ed. Gainesville: University of Florida, 1999. 92 p.

MELLAU, L. S. B.; JORGENSEN, R. J.; ENEMARK, J. M. D. Plasma calcium, inorganic phosphate and magnesium during hypocalcaemia induced by a standardized EDTA infusion in cows. **Acta Veterinary Scandinavian**, v. 42, p. 251-260, 2001.

MINITAB – The student edition of MINITAB Statistical software adapted for education. Release 13.0. **User's Manual**. New York: Addison-Wesley, 2000. CD-ROM.

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

ORTOLANI, E. L. Macro e microelementos. In: Spinosa, H. S.; Górnaiak, S. L.; Bernardi, M. M. (Eds.) **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 750-762.

PAULINO, C. A.; BONDAN, E. F. Cálcio e fósforo. In: Spinosa, H. S.; Górnaiak, S. L.; Bernardi, M. M. (Eds.) **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 383-395.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary medicine**. 10. ed. Edimburgo: Saunders Elsevier, 2007. 2156 p.

REED, S. M.; BAYLY, W. M. **Medicina interna eqüina**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 938 p.

RICHARDSON, J. D.; HARRISON, L. J.; EDWARDS, G. B. Two horses with hypocalcaemia. **Veterinary Record**, v. 129, n. 5, p. 98, 1991.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265 p.

SCARRATT, W. K.; FURR, M. O.; ROBERTSON, J. L. Hepatoencephalopathy and hypocalcemia in a miniature horse mare. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 199, n. 12, p. 1754-1756, 1991.

SMITH, V. R.; BROWN, W. H. Response of some blood constituents to infusion of disodium ethylenediamine tetraacetate in intact cattle. **Journal Dairy Science**, v. 46, n. 3, p. 223-226, 1963.

TORIBIO, R. E.; KOHN, C. W.; CHEW, D. J.; SAMS, R. A.; ROSOL, T. J. Comparison of serum parathyroid hormone and ionized calcium and magnesium concentrations and fractional urinary clearance of calcium and phosphorus in healthy horses and horses with enterocolitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 6, p. 938-947, 2001.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **Journal of Clinical Pathology**, v. 22, n. 2, p. 158-161, 1969.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. **The mineral nutrition of livestock**. 3. ed. Wallingford: Cabi Publishing, 1999. 614 p.

WIJNBERG, I. D.; VAN-DER-KOLK, J. H.; FRANSSEN, H.; BREUKINK, H. J. Electromyographic changes of motor unit activity in horses with induced hypocalcemia and hypomagnesemia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 6, p. 849-856, 2002.

ZIGUER, E. A.; FONTOURA JÚNIOR, J. A. S. D.; CASTILHO, E. M.; MENEZES, L. M.; SEGANFREDO, J. C.; CORRÊA, M. N.; DIONELLO, N. J. L. Impacto econômico e produtivo de afecções metabólicas em bovinos de leite no estado do Rio Grande do Sul. http://www.ufpel.edu.br/xivcic/arquivos/CA_00695.rtf. Acesso dia 17/02/2006.