

LUIZ HENRIQUE DE ARAÚJO MACHADO

**Perfil hormonal e metabolismo de cálcio em cadelas
gestantes e no puerpério.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
Veterinária da Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Campus de
Botucatu, para a obtenção do título de
Doutor em Medicina Veterinária (Área de
Concentração: Reprodução Animal).

Botucatu

2004

LUIZ HENRIQUE DE ARAÚJO MACHADO

**Perfil hormonal e metabolismo de cálcio em cadelas
gestantes e no puerpério.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
Veterinária da Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Campus de
Botucatu, para a obtenção do título de
Doutor em Medicina Veterinária (Área de
Concentração: Reprodução Animal).

Orientador: Prof. Adj. Nereu Carlos Prestes

Botucatu

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Machado, Luiz Henrique de Araújo.

Perfil hormonal e metabolismo de cálcio em cadelas gestantes e no puerpério / Luiz Henrique de Araújo Machado. – 2004.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, 2004.

Orientador: Nereu Carlos Prestes

Assunto CAPES: 50504002

1. Cão – Reprodução 2. Obstetrícia veterinária

CDD 636.708982

Palavras-chave: Cães; Cálcio; Endocrinologia; Gestação; Puerpério

A Deus, pela vida.

Agradecimentos

Ao meu orientador por ter deixado que eu o escolhesse e por ter confiado em mim;

Ao canil Von Springer, em especial Marcelo Gaeta e Maíra Silvestre, que sem seu auxílio esta pesquisa não seria possível;

À FAPESP pelo auxílio à pesquisa;

À professora Eunice Oba por ceder seu laboratório para as dosagens hormonais;

Aos docentes, funcionários e residentes da Reprodução Animal;

Aos funcionários do laboratório clínico da PUC Minas Poços de Caldas;

A todos os amigos da PUC Minas Poços de Caldas, por terem me dado forças para continuar;

Ao Prof. Marcelo Landim Brisola pelo tratamento estatístico dos dados obtidos, pela análise dos resultados e pelas sugestões;

À Profa. Maria Denise Lopes, que antes de ser professora foi uma amiga, com conselhos e correções sempre de uma pertinência incrível;

À banca examinadora, que antes de tudo quer aprimorar esta tese;

Ao meu grande amor, Bió, por ser minha companheira e amiga e por ter me dado nossa filha Ana;

Aos meus pais e irmãos, que mesmo longe tenho certeza que torcem por mim;

A todos os funcionários, residentes e professores da UNESP-Botucatu, por que sem vocês a minha formação não seria a mesma;

À bibliotecária Selma Maria de Jesus;

Aos meus alunos, que não me deixam um só dia sem pensar e estudar;

Aos amigos Wildo, Liliane, Mauro, Marcus, Rosendo e Otávio, amigos de sempre.

Ao veterinário Sérgio Daltro, por ter sido meu primeiro mestre e ter me dito "CARPE DIEM";

Aos meus cães, em especial a saudosa Fafá.

Vê mais longe a gaivota que voa mais alto.

Resumo

MACHADO, L. H. A. Perfil hormonal e metabolismo de cálcio em cadelas gestantes e no puerpério. Botucatu, 2004. 126p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP-Botucatu.

O presente projeto pretendeu estudar o ciclo hormonal e o metabolismo de cálcio das cadelas durante a gestação e puerpério e testar a eficiência do método da quimioluminescência como uma alternativa ao RIA. Foram utilizadas 10 cadelas adultas com tamanho e peso semelhantes, mantidas sob as mesmas condições de manejo e alimentadas com ração de boa qualidade, sem qualquer suplementação até os 40 dias de gestação, após isto a ração foi substituída por ração de filhote até o final da lactação. As colheitas de sangue foram realizadas durante as fases gestacional e puerperal, nos momentos: M0 (início do diestro citológico), M1 (20 dias pós-M0), M2 (40 dias pós-M0), M3 (momento do parto), M4 (15 dias pós-parto), M5 (45 dias pós-parto) e M6 (30 dias pós-desmame). O PTH, osteocalcina, calcitonina, progesterona, estradiol, T3 total, T4 total, T4 livre e calcitriol foram analisados pelo radioimunoensaio; T4 canino, T3 total, T3 livre, T4 total e T4 livre foram analisados pela quimioluminescência e o cálcio, fósforo, proteína total, albumina e fosfatase alcalina foram analisados pelo método colorimétrico. A osteocalcina e calcitonina foram testadas pelo método do RIA e não foram observadas diferenças entre os momentos. O T3 Livre testado pelo método de quimioluminescência e apresentou todos os valores abaixo do limite de detecção. As demais variáveis apresentaram diferenças significativas entre os momentos. Não foram observadas correlações que demonstrem envolvimento dos hormônios dosados com o metabolismo do cálcio e fósforo. Não houve correlação entre o número de filhotes e as demais variáveis estudadas; os resultados demonstram não ter havido tendência a hipocalcemia e correção hormonal; o estudo de correlações não demonstrou um padrão de acontecimento entre as diversas variáveis, principalmente entre o cálcio e as demais variáveis; a osteocalcina é mais específica como marcadora óssea que a fosfatase alcalina; a correção alimentar pode ter sido o motivo da quiescência mineral e dos hormônios relacionados a homeostase mineral, o mesmo ocorrendo com os valores de proteína total e albumina; os valores de estradiol se mantiveram estáveis durante toda a gestação; os hormônios que mais de correlacionaram com outras variáveis foram os tireoidianos; os momentos correspondentes a lactação foram os que apresentaram menor índice de correlação entre as variáveis; os kits de quimioluminescência de dosagem de T3 total e livre e T4 total não apresentaram sensibilidade que justifique a substituição do RIA como método de escolha; o kit de quimioluminescência de T4 canino demonstrou boa sensibilidade e especificidade e os métodos de RIA utilizados para mensuração de osteocalcina, calcitonina e calcitriol demonstraram ter boa sensibilidade e eficiência.

Palavras chave: Cães; Cálcio; Endocrinologia; Gestação; Puerpério.

Abstract

MACHADO, L. H. A. Hormone profile and calcium metabolism in bitches during gestation and puerperal period. Botucatu, 2004. 126p. Thesis (PhD). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP-Botucatu.

The present project intended to study hormone cycle and calcium metabolism of bitches during gestation and the puerperal period and to test the efficiency of chemoluminescent immune assay as an alternative to RIA. Ten adult bitches of similar size and weight, maintained under the same environmental conditions and fed with high quality dry food without any supplementation until the fortieth day of gestation, then changed to puppy dry food until the end of lactation. Blood samples were collected during gestation and the puerperal period, on moments M0 (beginning of cytologic diestrus), M1 (20 days after M0), M2 (40 days after M0), M3 (at the time of parturition), M4 (15 days after parturition), M5 (45 days after parturition) and M6 (30 days after weaning). PTH, osteocalcin, calcitonin, progesterone, estradiol, total T3, total T4, free T4 and calcitriol were analyzed by RIA; canine T4, total T3, free T3, total T4 and free T4 were analyzed by chemoluminescence and calcium, phosphorus, total protein albumin and alkaline phosphatase were analyzed by colorimetric method. There was no difference between moments on values of osteocalcin and calcitonin. All values of free T3 were below the limit of detection of the test. The other variables studied presented no difference between moments. There was no correlation demonstrating the involvement of tested hormones on calcium and phosphorus metabolism. There was no correlation between litter size and the other parameters studied; the results showed no tendency to hypocalcaemia and hormone correction; the study of correlations did not suggest a pattern of happening among variables, specially between calcium and the other variables; osteocalcin is more specific as bone maker that alkaline phosphatase; nutritional correction may have been the responsible for the quiescence of minerals and related hormones, the same occurring to the values of total protein and albumin; values of estradiol maintained constant during gestation; the hormones that most correlated to other variables were thyroid hormones; the moments referring to lactation presented lowest indexes of correlation between variables; kits for dosage of total and free T3 and total T4 by chemoluminescence did not present sensibility enough to justify replacing of RIA as a choice method; canine T4 chemoluminescence kit demonstrated high sensibility and specificity and, finally, the methods of RIA used for osteocalcin, calcitonin and calcitriol demonstrated high sensibility and efficiency.

Key Words: dogs; calcium; endocrinology; gestation; puerperal period.

Lista de Abreviaturas

M0: início do diestro citológico

M1: 20 dias após o M0

M2: 20 dias após o M1

M3: dia do parto

M4: 15 dias após o parto

M5: 45 dias após o parto

M6: 30 dias após o desmame

T4 RIA: T4 total pelo radioimunoensaio

T3 RIA: T3 total pelo radioimunoensaio

T4 livre RIA: T4 livre pelo radioimunoensaio

Estradiol RIA: estradiol pelo radioimunoensaio

Progesterona RIA: progesterona pelo radioimunoensaio

PTH RIA: paratormônio pelo radioimunoensaio

Osteocalcina RIA: osteocalcina pelo radioimunoensaio

Calcitonina RIA: calcitonina pelo radioimunoensaio

Calcitriol RIA: calcitriol pelo radioimunoensaio

T4 Químio: T4 total pela quimioluminescência

T3 Químio: T3 total pela quimioluminescência

T3 livre Químio: T3 livre pela quimioluminescência

T4 livre Químio: T4 livre pela quimioluminescência

T4 canino Químio: T4 canino pela quimioluminescência

Ca = cálcio

P = fósforo

Nm: nanômetro

mg/dL = miligramas por decilitro

mm/ano: milímetros por ano

μ g/dL: micrograma por decilitro

pg/mL = picograma por mililitro

GH: hormônio do crescimento

ng/mL: nanograma por decilitro

PTH = Paratormônio

LH: hormônio luteinizante

RIA: radioimunoensaio

CRIESP: Centro de Radioimunoensaio de São Paulo

Sumário de Figuras

Figura 1: Ilustração das alterações hormonais e seqüência de eventos envolvendo o momento de ovulação e fertilização em cadelas.	33
Figura 2: Ilustração das alterações de células vaginais pela citologia vaginal correlacionadas com a concentração de estrógeno durante o ciclo estral de cadelas.	34
Figura 3: Citologia vaginal A esquema de célula superficiais com núcleo em cariorexis B célula superficial com núcleo em cariopcnose C imagem das duas células esquematizadas anteriormente. A1 esquema de célula superficial anucleada B1 imagem de célula superficial anucleada. Todas relacionadas ao proestro e estro de cadelas.	36
Figura 4: Citologia vaginal A células parabasais (seta curva) e neutrófilos (seta reta) B células parabasais/intermediárias pequenas relacionadas ao diestro de cadelas.	37
FIGURA 5: concentrações séricas de paratormônio (pg/dL) pelo radioimunoensaio durante os momentos, Botucatu-2004	49
FIGURA 6: concentrações séricas de calcitonina (pg/dL) pelo radioimunoensaio durante os momentos, Botucatu-2004	52
FIGURA 7: concentrações séricas de progesterona (ng/mL) pelo radioimunoensaio durante os momentos, Botucatu-2004	54
FIGURA 8: concentrações séricas de estradiol (pg/mL) pelo radioimunoensaio durante os momentos, Botucatu-2004	56
FIGURA 9: concentrações séricas de T3 total (ng/dL) pelo radioimunoensaio durante os momentos, Botucatu-2004	58
FIGURA 10: concentrações séricas de T4 total (μ g/dL) pelo radioimunoensaio durante os momentos, Botucatu-2004	62
FIGURA 11: concentrações séricas de T4 livre (ng/dL) pelo radioimunoensaio durante os momentos, Botucatu-2004	65
FIGURA 12: concentrações séricas de T4 livre (ng/dL) pela quimioluminescência durante os momentos, Botucatu-2004	67
FIGURA 13: concentrações séricas de T4 canino (μ g/dL) pela quimioluminescência durante os momentos, Botucatu-2004	69
FIGURA 14: concentrações séricas de calcitriol (pg/mL) pelo radioimunoensaio durante os momentos, Botucatu-2004	71

FIGURA 15: concentrações séricas de fósforo (mg/dL) durante os momentos, Botucatu-2004	73
FIGURA 16: concentrações séricas de cálcio (mg/dL) durante os momentos, Botucatu-2004	75
FIGURA 17: concentrações séricas de proteína total (mg/dL) durante os momentos, Botucatu-2004	77
FIGURA 18: concentrações séricas de albumina (mg/dL) durante os momentos, Botucatu-2004	79
FIGURA 19: concentrações séricas de fosfatase alcalina (mg/dL) durante os momentos, Botucatu-2004	81
FIGURA 20: curvas de valores médios de albumina, fósforo, calcitonina, T4 livre RIE, proteínas totais, T4 canino, progesterona, T4 total RIE, cálcio total, T4 livre quimiol. e estradiol durante os momentos, Botucatu-2004	82
FIGURA 21: curvas de valores médios de calcitriol, paratormônio, T3 total livre e fosfatase alcalina durante os momentos, Botucatu-2004	83

Sumário de Tabelas

Tabela 1- Momentos de colheita de amostras do experimento	40
Tabela 2 - tempo de gestação pós diestro citológico em dias.....	47
Tabela 3 - valores séricos de PTH pelo método do radioimunoensaio e analisados estatisticamente pelo teste <i>T de Student</i>	48
Tabela 4 - valores séricos de osteocalcina pelo método do radioimunoensaio analisados pelo teste <i>T de Student</i>	50
Tabela 5 - valores séricos de calcitonina pelo método do radioimunoensaio e analisados estatisticamente pelo teste <i>T de Student</i>	51
Tabela 6 - valores séricos de progesterona pelo método do radioimunoensaio e analisados estatisticamente pelo teste <i>T de Student</i>	53
Tabela 7 - valores séricos de estradiol pelo método do radioimunoensaio e analisados estatisticamente pelo teste <i>T de Student</i>	55
Tabela 8 - valores séricos de T3 total pelo método do radioimunoensaio e analisados estatisticamente pelo teste <i>T de Student</i>	57
Tabela 9 - valores séricos de T3 total pelo método da quimioluminescência e analisados estatisticamente pelo teste <i>T de Student</i>	59
Tabela 10 - valores séricos de T3 livre pelo método da quimioluminescência e analisados estatisticamente pelo teste <i>T de Student</i>	60
Tabela 11 - valores séricos de T4 total pelo método do radioimunoensaio e analisados estatisticamente pelo teste <i>T de Student</i>	61
Tabela 12 - valores séricos de T4 total pelo método da quimioluminescência e analisados estatisticamente pelo teste <i>T de Student</i>	63
Tabela 13 - valores séricos de T4 livre pelo método do radioimunoensaio e analisados estatisticamente pelo teste <i>T de Student</i>	64
Tabela 14 - valores séricos de T4 livre pelo método da quimioluminescência e analisados estatisticamente pelo teste <i>T de Student</i>	66
Tabela 15 - valores séricos de T4 canino pelo método da quimioluminescência e analisados estatisticamente pelo teste <i>T de Student</i>	68

Tabela 16 - valores séricos de calcitriol pelo método do radioimunoensaio e analisados estatisticamente pelo teste <i>T de Student</i>	70
Tabela 17 - valores séricos de fósforo durante o experimento e analisados estatisticamente pelo teste <i>T de Student</i>	72
Tabela 18 - valores séricos de cálcio total durante o experimento e analisados estatisticamente pelo teste <i>T de Student</i>	74
Tabela 19 - valores séricos de proteínas totais durante o experimento e analisados estatisticamente pelo teste <i>T de Student</i>	76
Tabela 20 - valores séricos de albumina durante o experimento e analisados estatisticamente pelo teste <i>T de Student</i>	78
Tabela 21 - valores séricos de fosfatase alcalina durante o experimento e analisados estatisticamente pelo teste <i>T de Student</i>	80
Tabela 22 - resultados da cadela 1 durante o experimento.....	99
Tabela 23 - resultados da cadela 2 durante o experimento.....	100
Tabela 24 - resultados da cadela 3 durante o experimento.....	101
Tabela 25 - resultados da cadela 4 durante o experimento.....	102
Tabela 26 - resultados da cadela 5 durante o experimento.....	103
Tabela 27 - resultados da cadela 6 durante o experimento.....	104
Tabela 28 - resultados da cadela 7 durante o experimento.....	105
Tabela 29 - resultados da cadela 8 durante o experimento.....	106
Tabela30 - resultados da cadela 9 durante o experimento.....	107
Tabela31 - resultados da cadela 10 durante o experimento.....	108
Tabela 32 - média e desvio padrão dos hormônios T4 RIA, T3 RIA, T4 livre RIA, estradiol, progesterona, PTH RIA, osteocalcina RIA e calcitonina RIA.	109
Tabela 33 - média e desvio padrão dos hormônios calcitriol RIA, T4 quimio, T3 quimio, T3 livre quimio, T4 livre quimio, T4 canino e cálcio.....	110
Tabela 34 - média e desvio padrão do fósforo, proteína total, albumina, fosfatase alcalina, número de filhotes e tempo de gestação.	111

Índice

Introdução	16
Objetivos.....	17
Revisão de Literatura	18
Materiais e Métodos.....	38
Local.....	38
Seleção e número de animais	38
Manejo.....	38
Colheita das amostras	39
Frequência de colheita das amostras	40
Dosagens laboratoriais	41
Método do radioimunoensaio.....	42
Método da quimioluminescência	43
Dosagem de fósforo sérico	43
Dosagem de cálcio total sérico.....	44
Dosagem de proteínas totais séricas e albumina sérica.....	44
Dosagem da fosfatase alcalina.....	45
Análise Estatística	45
Resultados	47
Tempo de gestação.....	47
PTH intacto sérico	48
Osteocalcina sérica.....	50
Calcitonina sérica.....	51
Progesterona sérica	53
Estradiol sérico.....	55
T3 total sérico	57
T3 livre sérico	60
T4 total sérico	61
T4 livre sérico	64
T4 canino	68
1,25 dihidroxivitamina D (calcitrol)	70
Fósforo sérico	72
Cálcio total sérico.....	74
Proteínas totais séricas e albumina sérica	76
Fosfatase alcalina.....	80
Controle citológico	84
Correlações entre variáveis encontradas	84

Discussão	87
Conclusões	97
Anexos.....	99
Referências Bibliográficas	112

Introdução

Atualmente com a melhoria dos cuidados com os animais domésticos e o progresso da Medicina Veterinária, tornou-se necessário um aprofundamento no conhecimento das doenças e o estabelecimento de rotina clínica e laboratorial para o seu diagnóstico. A nutrição veterinária é uma das áreas que apresenta uma evolução técnica intensa, colaborando para o aumento da longevidade e preservação do estado de higidez dos animais domésticos. Diante do exposto o presente trabalho estudou o perfil hormonal e o metabolismo de cálcio de cadelas durante a gestação e puerpério, com o propósito de estabelecer curvas padrão dos hormônios estudados, além de testar a eficiência do método da quimioluminescência como uma alternativa ao radioimunoensaio, com o propósito de substituir o método de dosagem hormonal através do radioimunoensaio por outro mais rápido e seguro.

Objetivos

1. Estabelecer valores hormonais padrão e bioquímicos durante a gestação e lactação em cadelas;
2. Estudar o metabolismo hormonal e de cálcio;
3. Correlacionar as variáveis estudadas;
4. Determinar valores normais pelo método do radioimunoensaio para dosagem sérica de 1,25 dihidroxivitamina D, osteocalcina e calcitonina em cadelas;
5. Correlacionar os achados com o número de filhotes;
6. Viabilizar o método da quimioluminescência para o controle hormonal de cadelas;

Revisão de Literatura

A assistência nutricional enteral provê caloria aos animais (Marcin, Kallas e Dimand, 2001). As necessidades nutricionais diárias devem ser calculadas para evitar pacientes subnutridas (Nelson & Couto, 1994).

A nutrição inadequada, decorrente de anorexia ou aumento de gasto energético, tem uma série de conseqüências adversas, como a imunidade mediada celular e humoral prejudicadas, incapacidade de suportar adversidades, bem como cirurgias (Abood *et al.*, 1998).

Os animais necessitam de energia, proteínas, minerais e vitaminas para um metabolismo corporal normal. Caso estas substâncias não sejam ingeridas em quantidades suficientes elas serão fornecidas pelo próprio organismo e esta "autodigestão" leva a baixa imunidade, fraqueza muscular, redução da resistência à infecções e óbito (Bouvy, Richard e Dupré, 1996; Crisp & Buffington, 1998; Garnier, 2000).

A má nutrição e a desnutrição são duas das principais causas de mortalidade e morbidade de animais, podendo comprometer a eficácia de outros tratamentos, devendo-se realizar, nestes casos, suporte nutricional (Crane, 1993; Bouvy, Richard e Dupré, 1996). Pacientes

subnutridos ou submetidos a qualquer tipo de estresse apresentam freqüentemente anorexia.

O cálcio e fósforo são necessários para a mineralização do esqueleto fetal, sendo que o aumento na ingestão destes minerais é importante e ocorre principalmente durante o terço final da gestação. As principais fontes que determinam o fornecimento destes minerais aos fetos são a nutrição materna, seus depósitos esqueléticos e hormônios calciotrópicos (Pitkin, 1985; Molina-Font, 1998).

Durante a gestação e lactação ocorre incremento mineral materno e metabolismo ósseo, podendo levar a deficiência mineral materna (Malluche et al, 1982; Gruber, Gutterridge & Baylink, 1984; Brommage & Deluca, 1985; Colussi et al, 1987; Fukuda & Iida, 1993).

É bastante conhecido que os osteoblastos sintetizam uma matriz calcificada, que é essencial para a formação do osso, e que por sua vez depende da homeostase de cálcio e fósforo (Stains & Gay, 1998), que é controlada hormonalmente (Fukuda & Iida, 1993).

Nos caninos existem quatro glândulas paratireóides anexas à tireóide, duas são externas e inseridas na parte cranial dos lobos tireoidianos, e duas são internas, geralmente localizadas na parte

caudal dos lobos tireoidianos. As externas medem entre um e sete milímetros dependendo do porte do animal (Capen & Martin, 1977; Venzke, 1986; Hendy et al, 1989; Banks, 1992).

Existem duas formas de hiperparatireoidismo: a primária e a secundária. A forma secundária, compensatória, pode ocorrer devido a duas causas. Uma por desvios nutricionais no equilíbrio Ca:P que induzem à reabsorção do cálcio, sendo freqüente em animais domésticos, principalmente em eqüinos e suínos (Lúcio et al, 1973; Weller, Cullen & Dagle, 1985; Lamb, 1990). Outra, geralmente crônica, é decorrente de moléstias renais e apresenta incidência alta em animais domésticos (Lúcio et al, 1973; Watson & Canfield, 1979; Weller & Cliver, 1981), sendo induzida por alterações da homeostase mineral (Yaphé & Forrester, 1994).

Alterações da homeostase mineral de cálcio e fósforo são determinantes para o estabelecimento do hiperparatireoidismo secundário. O calcitriol, a calcitonina e o PTH são responsáveis por estas alterações, atuando nos rins, ossos e intestinos (Capen & Martin, 1977; Chew & DiBartola, 1992; Yaphé & Forrester, 1994).

O mecanismo de retirada do cálcio dos ossos ocorre de três formas: proliferação da célula osteoprogenitora para osteoclastos, mobilização de cálcio do osso perilacunar pelos osteócitos profundos e pela regulação do fluxo de cálcio pelos osteócitos superficiais, mantendo um nível fixo de cálcio plasmático (Slatopolsky, Martin & Hruska, 1980).

O paratormônio (PTH) é um polipeptídeo de cadeia simples, contendo 84 aminoácidos, que atua no metabolismo de cálcio e fósforo. Este hormônio favorece a absorção intestinal e reabsorção nos ossos de cálcio e fósforo; atua ainda nos rins promovendo aumento na reabsorção de cálcio e na excreção de fósforo. O aumento da atividade osteocítica e osteoclástica e da produção de calcitriol nos rins também é função do paratormônio (Capen & Martin, 1977; Slatopolsky, Martin & Hruska, 1980; High, Capen & Black, 1981; Klahr & Slatopolsky, 1986; Banks, 1992; Chew & DiBartola, 1992; Yaphé & Forrester, 1994; Rosol & Capen, 1996; Paulino & Bondan, 1999).

A existência de três frações do PTH (amino-terminal (1-34), carboxi-terminal (39-84) e a fração intacta) foi demonstrada experimentalmente (Silverman & Yalow, 1973).

HIGH, BLACK & CAPEN (1981) em estudo experimental demonstraram que a administração de PTH possui maior efeito ósseo em animais com propensão a alterações na homeostase de cálcio e fósforo.

O calcitriol, ou 1,25-dihidroxitamina D₃, atua nas glândulas paratireóides inibindo a síntese de PTH, nos ossos estimulando a reabsorção de cálcio em conjunto com o PTH, nos rins aumentando a reabsorção de cálcio e por retroalimentação negativa inibindo sua própria produção e nos intestinos promovendo a absorção de cálcio e fósforo (Capen & Martin, 1977; High, Capen & Black, 1981; Yaphé & Forrester, 1994; Brown et al, 1997). Segundo POWER & FOTTRELL (1991) a síntese de osteocalcina depende do calcitriol. A síntese desta vitamina está correlacionada com aumento da concentração de estrógeno, do hormônio do crescimento (GH) e da prolactina (Rosol & Capen, 1996). A placenta aumenta a concentração de calcitriol (Paulino & Bondan, 1999).

A calcitonina, secretada pelas células parafoliculares da glândula tireóide (Banks, 1992; Paulino & Bondan, 1999), desempenha papel relativamente secundário na homeostase mineral de cálcio e

fósforo, sendo liberada em resposta ao aumento da concentração sérica de cálcio, limitando a reabsorção osteoclástica de tecido ósseo e promovendo a excreção urinária de cálcio e fósforo (Chew & DiBartola, 1992; Pienkowski et al, 1997). Cães tratados com calcitonina apresentam um significativo aumento no tempo de mineralização óssea (Pienkowski et al, 1997). A calcitonina é utilizada como tratamento de hipoestrogenismo em mulheres na menopausa ou animais ovariectomizados (Lynch et al, 1991; McCubbrey et al, 1993).

A osteocalcina, ou proteína GLA-óssea, é uma proteína óssea específica, sintetizada pelos osteoblastos, sendo um indicador da formação óssea (Power & Fottrell, 1991; Arican, Carter & Bennett, 1996; Allen & Richardson, 1998). Aproximadamente 3% da osteocalcina produzida é incorporada à matriz óssea e sua função ainda é desconhecida. Aparentemente toma parte na formação do osso (Hauschka, Lian & Gallop, 1975, Price et al, 1976, Poser et al, 1980; Arican, Carter & Bennett, 1996), porém tem sido dada atenção a esta proteína, pois apresenta-se como um marcador do "*turnover*" ósseo mais fiel do que a fosfatase alcalina ou a hidroxiprolina urinária e por ter concentração aumentada em processos de alteração na

mineralização óssea (Power & Fottrell, 1991; Allen & Richardson, 1998). Sua síntese depende da vitamina K₁ sendo estimulada pela 1,25-dihidroxitamina D₃ (Power & Fottrell, 1991; Allen & Richardson, 1998). A mensuração desta proteína tem sido bastante utilizada em situações de alterações renais, metabólicas ósseas, hipertireoidismo e excesso de glicocorticóides (Power & Fottrell, 1991; Arican, Carter & Bennett, 1996). Segundo POWER & FOTTRELL (1991) acima de 90% da estrutura da proteína se preserva entre humanos, ovinos e bovinos.

Os métodos mais utilizados para detecção da osteocalcina são o radioimunoensaio e enzimaímunoensaio, com anticorpos mono ou policlonais de ovelha e/ou coelho (Price & Nishimoto, 1980; Delmas et al, 1983; Gundberg et al, 1984, Gundberg et al, 1985; Power, Gosling & Fottrell, 1989; Tanaka et al, 1989; Arican, Carter & Bennett, 1996).

A tireóide está implicada com alterações no ciclo estral em cadelas quando há diminuição acentuada de tiroxina (T₄) e triiodotironina (T₃) (Peter, Gaines & Smith, 1989; Davidson, 2000). Os hormônios da tireóide estão relacionados com a redução da absorção intestinal de cálcio, de maneira inversamente proporcional (Rosol & Capen, 1996; Davidson, 2000). A tiroxina, demonstrou-se em trabalhos

experimentais, promove taxa de formação, remodelamento e aumento ósseo (High, Capen & Black, 1981). FELDMAN & NELSON (1987b) referiram o estrógeno como fator de aumento de concentração de T3 e T4. REIMERS et al (1984) atestaram que o T4 está aumentado nas cadelas em diestro ou gestantes, provavelmente pela ação da progesterona e que o T3 apresenta concentração maior em cadelas no diestro do que em cadelas prenhes.

As dosagens dos hormônios da tireóide geralmente são feitas com kits de radioimunoensaio humanos, porém existem problemas com esta utilização, principalmente pelo limite de detecção, que é menor do que o desejado (Reimers et al, 1981; Eckersall & Willians, 1983). Um modo de evitar este problema é estimular o animal com TSH (hormônio tireoestimulante) (Lorenz & Stiff, 1980), pois a produção de um kit específico é dificultada pela insuficiência de rotina (Belshaw & Rijnbeck, 1979; Mincey & McTaggart, 1980; Eckersall & Willians, 1983). Kits diagnósticos humanos de radioimunoensaio foram testados e validados para dosagem sérica de T4 total, T4 livre e T3, com boa sensibilidade e especificidade (Young, Sartin & Kemppainen, 1985; Lee, Lamb & Reimers, 1991; Nelson et al, 1991; Reimers et al, 1991; Torres,

McKeever & Johnston, 1991; Panciera & Post, 1992). Num destes estudos apenas 17 a 20% dos animais não responderam a determinação por apresentarem valores abaixo do limite do método. Atualmente já existe kit específico para dosagem do T4 total canino pelo método da imunoquimioluminescência (Silva, 2001)¹.

O estrógeno está correlacionado com o metabolismo ósseo por diminuir o "turnover" ósseo (Cruess & Hong, 1979; Shen et al, 1993), sendo que a sua deficiência pode levar à ocorrência de alterações como a osteoporose. A concentração deste hormônio não aumenta durante a gestação ou próximo ao parto segundo HADLEY (1975), AUSTAD, LUNDE & SJAASTAD (1976) e VANNUCCHI (2000), porém FELDMAN & NELSON (1987a), bem como CONCANNON et al (1989) relataram aumentos significativos durante a gestação, com pico anterior ao parto, porém com concentrações menores do que no final do proestro. SHEN et al (1993) demonstraram que o estrógeno aumenta a concentração sérica de calcitriol e este por sua vez aumenta a expressão de osteocalcina. PAULINO & BONDAN (1999) associaram o estrógeno com a diminuição da reabsorção tubular de fosfato. O

¹ Silva, R. L. DPC-Medlab (Comunicação Pessoal)

estrógeno reduz a reabsorção óssea atuando indiretamente inibindo a produção de interleucina-6 (que estimula atividade osteoclástica) e diretamente na remodelação óssea pelos receptores de estrógeno em células ósseas. Métodos diagnósticos humanos de radioimunoensaio foram testados e validados para dosagem sérica de estradiol em cães, com boa sensibilidade e especificidade (Willard *et al.*, 1986; Reimers *et al.*, 1991; Verstegen *et al.*, 1997; Gudermuth *et al.*, 1998). O estrógeno também atua também promovendo mudanças drásticas no útero e mucosa vaginal, o que é facilmente visível durante o proestro e estro, com presença de hemácias e células superficiais de descamação observadas na citologia vaginal (Feldman & Nelson, 1996a).

A progesterona é considerada o hormônio de manutenção da gestação em cadelas, com sua concentração aumentando logo após o pico ovulatório de LH (hormônio luteinizante) (Hadley, 1975; Gräf, 1978; Purswell & Parker, 2000; Vannucchi, 2000; Root Kustritz, 2001; Davidson & Feldman, 2004; Schaefers-Okkens, 2004), apresentando pico entre 15 (Gräf, 1978; Vannucchi, 2000) e 18 dias (Hadley, 1975) e declinando continuamente até o parto ou final do diestro em cadelas não gestantes (Hadley, 1975; Gräf, 1978; Vannucchi, 2000; Schaefers-

Okkens, 2004). ONCLIN & VERSTEGEN (1997) relataram que a hipófise e os ovários são necessários para uma secreção normal de progesterona.

GUDERMUTH *et al.* (1998) relataram que as concentrações de progesterona na cadela gestante são superiores às de cadelas em diestro, porém não-gestantes. Estes valores foram observados por VANNUCHI (2000) em trabalho experimental, com concentrações médias de progesterona em cadelas gestantes de 16,88ng/mL e em cadelas não-gestantes de 13,63 ng/mL.

Kits diagnósticos humanos de radioimunoensaio foram testados e validados para dosagem sérica de progesterona, com boa sensibilidade e especificidade (Willard *et al.*, 1986; Lee, Lamb & Reimers, 1991; Reimers *et al.*, 1991; Onclin & Verstegen, 1997; Gudermuth *et al.*, 1998).

O aumento de níveis séricos de progesterona e/ou estrógeno está correlacionado com o aumento do hormônio do crescimento (GH). Este hormônio possui funções catabólicas, com ação no metabolismo de carboidratos e gorduras, interferindo na atuação da insulina em tecidos periféricos, e anabólicas com produção de somatomedinas, que

incrementam a condrogênese e o crescimento ósseo (Feldman & Nelson, 1987c). Alguns autores relataram que ocorre um estímulo da Ca^{+2} -adenosina-trifosfatase intracelular, o que promove uma alteração na concentração intracelular de cálcio e um balanço positivo de nitrogênio e fósforo, aumentando a concentração de fósforo e promovendo aumento da absorção de cálcio no trato digestório (Feldman & Nelson, 1987c; Ortolani, 1999; Paulino & Bondan, 1999).

A prolactina é uma proteína de 23.000 daltons, sua concentração ao longo do ciclo estral se mantém em níveis basais (2 a 4 ng/mL), alcançando 50 ng/mL no final da gestação e início da lactação (De-Coster *et al.*, 1983). Nas cadelas a prolactina é considerada a responsável pela manutenção do corpo lúteo, permitindo a produção de progesterona (Stabenfeldt & Edqvist, 1984; Feldman & Nelson, 1987a; Matsuda *et al.*, 1990; Onclin *et al.*, 1993; Johnston, Root Kustritz e Olson, 2001). Normalmente a prolactina tem sua concentração inversamente proporcional à de progesterona (Feldman & Nelson, 1996a; Jöchle, 1997), exceto na segunda metade da fase luteínica, em que há inibição da secreção de prolactina, que por sua vez causa diminuição abrupta na secreção de progesterona (Schaefers-Okkens,

2004). Para melhor entendimento JOHNSTON, ROOT KUSTRITZ E OLSON (2001) e SCHAEFERS-OKKENS (2004) relataram que a fase luteínica é dividida em duas partes iguais, sendo que na primeira metade o corpo lúteo atua sem dependência da prolactina, porém na segunda metade a prolactina atua como um fator luteotrópico.

O método analítico mais utilizado para mensuração hormonal é o radioimunoensaio (RIA), utilizando o iodo radioativo (^{125}I). Originariamente desenvolvido para mensuração em humanos, foi padronizado para animais, através da utilização de anticorpo policlonal de ovelha ou outros animais (Reimers *et al.*, 1981; Akmal *et al.*, 1985; Petrites-Murphy, *et al.*, 1989; Hansen *et al.*, 1992; King *et al.*, 1992; Morita *et al.*, 1992; Rosol & Capen, 1996).

Trabalhos experimentais demonstraram que a hemólise não altera os valores séricos de tiroxina, triiodotironina, progesterona e estradiol pelo método de radioimunoensaio, enquanto que à temperatura de 20 a 22°C existe diminuição de concentração dos hormônios (Reimers *et al.*, 1991). Animais com hiperlipidemia, até 700 mg/dL, não apresentaram alterações de concentração para progesterona e tiroxina (Lee, Lamb & Reimers, 1991).

Atualmente estão sendo pesquisados outros métodos para serem utilizados como alternativa ao radioimunoensaio, sendo que os principais motivos são os fatores de segurança (Jericó *et al.*, 1999; Lazaretti *et al.*, 1999) e o tempo de incubação (Garner & Leigth, 1999). Um destes é o método da imunoquimioluminescência (ICMA), que demonstra boa correlação com o radioimunoensaio (Exner & Koutts, 1986; Morita *et al.*, 1992), apresentando melhor sensibilidade do que o RIA (Morita *et al.*, 1992) e pode ser utilizado em transoperatório, com apenas sete minutos de incubação, ao contrário do radioimunoensaio que exige tempo de incubação de 22 horas (Garner & Leigth, 1999).

Este método, já testado em humanos, para o PTH intacto possui dois anticorpos, o anti-PTH 1-34 e o anti-PTH 44-84, porém é preconizada a dosagem em caninos através do uso de anti-PTH 1-34 e anti-PTH 39-84 (Feldman & Nelson, 1996b). MACHADO (2000) utilizou este método em cães saudáveis e nefropatas; no grupo dos cães saudáveis 66,7% dos animais apresentaram valores abaixo do limite mínimo do método ($< 1\text{pg/mL}$), demonstrando que os anticorpos talvez não sejam os ideais, porém no grupo dos animais doentes os valores encontrados variaram de 12,2 a 505 pg/mL.

GUDERMUTH *et al.* (1998), em trabalho experimental correlacionaram as dosagens de estradiol e progesterona em sangue periférico e nas fezes de cães, encontrando correlação estatística favorável. Este trabalho teve como princípio básico a sua utilização em animais selvagens e para diminuir o estresse em animais domésticos. Outros autores chegaram à mesma conclusão quanto a progesterona, porém observaram um atraso nas concentrações fecais pela metabolização hepática e excreção biliar e intestinal (Hay *et al.*, 2000).

A determinação do momento da ovulação em cadelas é mais difícil do que em outras fêmeas de mamíferos, por não haver tempo fixo entre o aumento de progesterona e a ovulação (Wildt, *et al.*, 1979; Hay *et al.*, 2000; Root Kustritz, 2001; Betini, Moraes e Rigolon, 2001). Conforme já descrito em relatos anteriores, entre o proestro e estro ocorre uma inversão nas concentrações de estrógeno e progesterona, porém o que determina a ovulação é o pico de LH que surge dois dias após esta inversão, que caracteriza o início do estro. Do dia 3 (processo final de maturação dos folículos) ao 7 pode ocorrer a ovulação, do dia 4 ao 9 ocorre a capacitação de oócitos primários, do

dia 4 ao 9 pode haver fertilização e o 10º dia é considerado o início do diestro (FELDMAN & NELSON, 1996a; Johnston, Root Kustritz e Olson, 2001) (FIGURA 1). JOHNSTON, ROOT KUSTRITZ e OLSON (2001a) determinaram que o 1º dia do diestro citológico corresponde ao 8º ou 9º dia pós pico de LH. A média de tempo gestacional quando se toma com base o início do diestro citológico para a determinar o início da gestação é de 56,9 dias (Johnston, Root Kustritz e Olson, 2001).

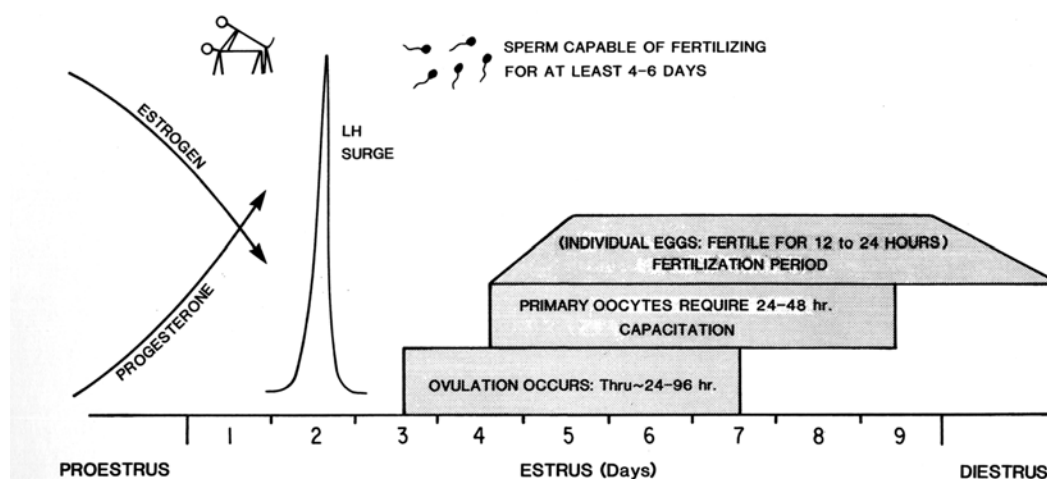


Figura 1: Ilustração das alterações hormonais e seqüência de eventos envolvendo o momento de ovulação e fertilização em cadelas.

Fonte: Nelson & Feldman (1996a)

A monitorização das alterações em células queratinizadas pela citologia vaginal (FIGURA 2), associada a dosagens de progesterona sequenciais é o método mais utilizado para avaliar o momento da ovulação (Wildt, *et al.*, 1979; Hay *et al.*, 2000; Root Kustritz, 2001;

Betini, Moraes e Rigolon, 2001). CONCANNON & DIGREGORIO (1986) relataram que mudanças nas células vaginais de descamação são um simples e rápido método de avaliação da progressão do ciclo estral. FELDMAN & NELSON (1996a) relataram ainda a possibilidade de se fazer o controle do pico de LH.

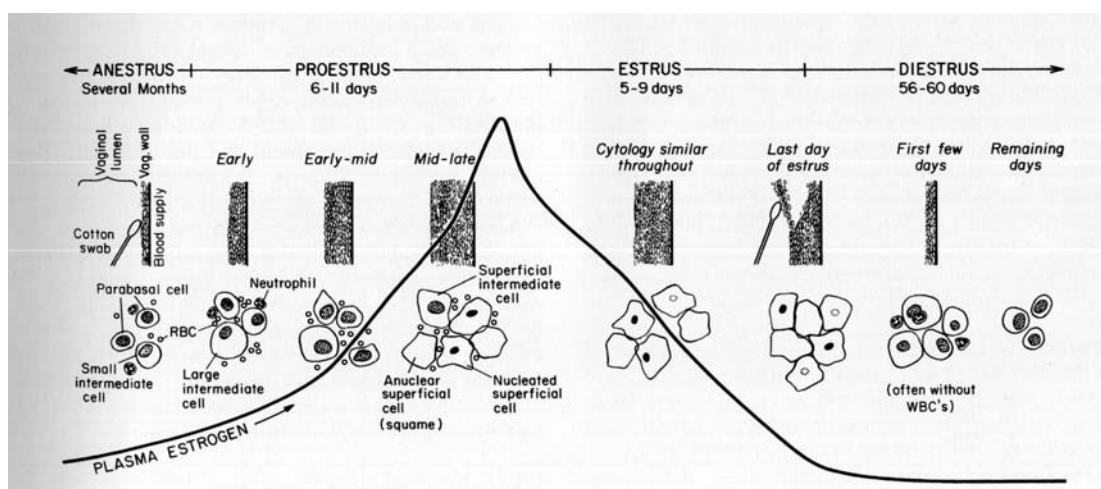


Figura 2: Ilustração das alterações de células vaginais pela citologia vaginal correlacionadas com a concentração de estrogênio durante o ciclo estral de cadelas.

Fonte: Nelson & Feldman (1996a)

Segundo CONCANNON & DIGREGORIO (1986) o momento de transição entre o estro vaginal e o diestro ocorre em um período de 1 a 3 dias, caracterizado pelo reaparecimento de células parabasais. Esta transição se torna mais óbvia nos próximos 1 a 2 dias, durante os quais as células não superficiais se tornam uma porcentagem significativa do

total de células presentes. NEVES *et al.* (2001) e SCHAEFERS-OKKENS (2004) relataram que o início do diestro é marcado pela transição de células superficiais para intermediárias e parabasais, além de leucócitos.

FELDMAN & NELSON (1996a), GOODMAN (2001), NEVES *et al.* (2001), ROOT KUSTRITZ (2001) e DAVIDSON & FELDMAN (2004) relataram que em geral há presença de hemácias no esfregaço de citologia vaginal durante o estro, além de 80 a 100% de células superficiais e ausência de neutrófilos (FIGURA 3). A citologia vaginal sofre alteração abrupta no início do diestro, com o reaparecimento das células epiteliais parabasais e, freqüentemente; neutrófilos (FIGURA 4).

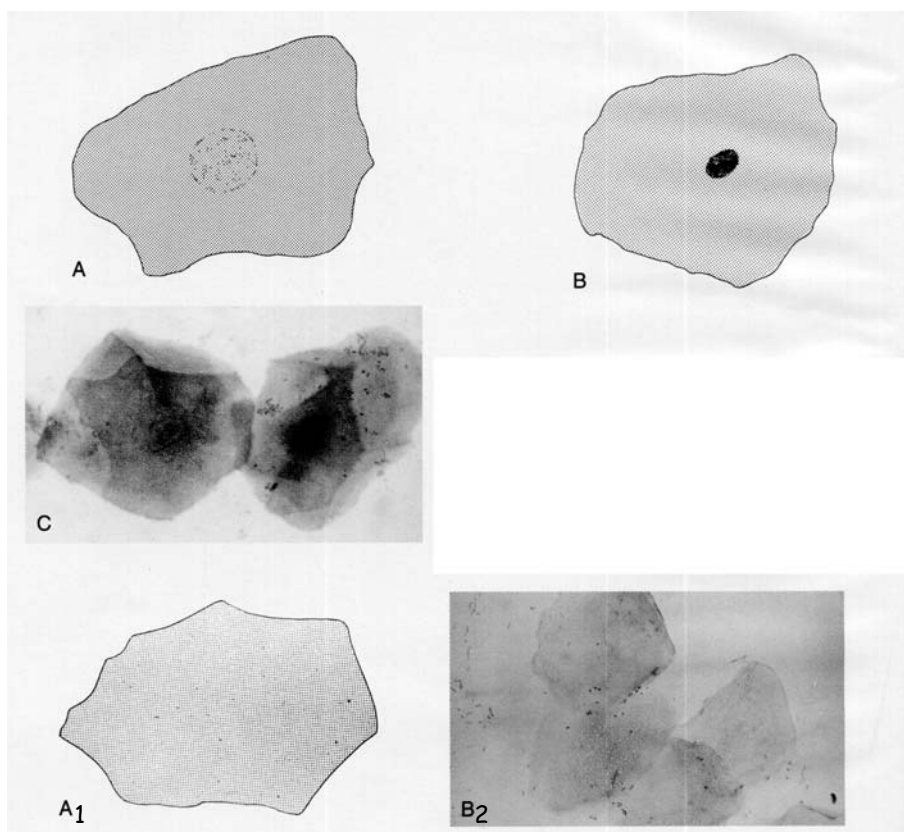


Figura 3: Citologia vaginal **A** esquema de célula superficiais com núcleo em cariorexis **B** célula superficial com núcleo em cariopícnose **C** imagem das duas células esquematizadas anteriormente. **A1** esquema de célula superficial anucleada **B1** imagem de célula superficial anucleada. Todas relacionadas ao proestro e estro de cadelas.

Fonte: Johnston, Root Kustritz e Olson (2001)

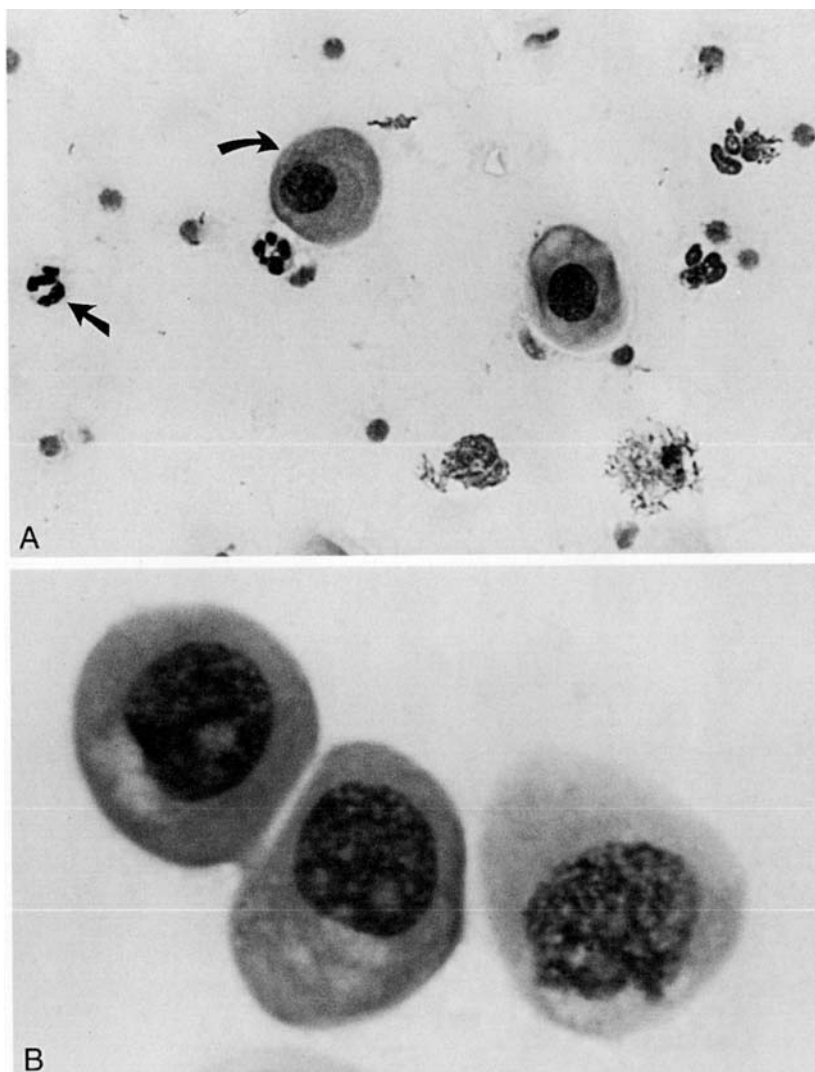


Figura 4: Citologia vaginal **A** células parabasais (seta curva) e neutrófilos (seta reta) **B** células parabasais/intermediárias pequenas relacionadas ao diestro de cadelas.

Fonte: Johnston, Root Kustritz e Olson (2001)

Materiais e Métodos

Local

Os animais utilizados neste experimento são pertencentes ao Canil Von Springer, canil de renome e considerado o melhor canil de Springer Spaniel Inglês nos anos 2000 a 2003.

O canil está localizado no município de Avaré, sudoeste do estado de São Paulo, a 766 metros de altitude, longitude 48°55' e latitude 23°6', índice pluviométrico de 1274 mm/ano, clima quente e seco e temperatura variando entre 17 e 33°C.

Seleção e número de animais

O grupo foi composto por 10 cadelas gestantes adultas da raça Springer Spaniel Inglês, com peso médio de 18,0 Kg, mantidas sob acompanhamento rigoroso de alimentação durante o período de colheitas.

Manejo

Os animais foram mantidos em canis não cimentados de 400m² até os 40 dias de gestação, quando foram transferidas para a maternidade (recinto fechado de 12 m² com solário), onde

permaneceram até o desmame. A mesma condição de manejo e alimentação foi utilizada em todas as cadelas.

Os animais foram alimentados com ração de boa qualidade², em quantidades diárias conforme recomendações constantes na embalagem levando em conta o peso de cada cadela, sem qualquer suplementação até os 40 dias de gestação, quando foi substituída por ração de filhote³ até o final da lactação. Aos animais foi mantida água *ad libitum*.

Colheita das amostras

A colheita do sangue foi realizada através de venopunção jugular, sempre no período da manhã, com as cadelas contidas fisicamente em decúbito lateral, utilizando-se coletores a vácuo⁴, obtendo-se amostras de 10,0 mL de sangue. Imediatamente após a colheita o sangue foi centrifugado (1000xG/10 min) para obtenção do soro.

²Ração Royal Canin maxi adult 1 super premium

³Ração Royal Canin maxi filhotes super premium

⁴Vacutainer c/ gel separador – BD + Agulhas p/ vacutainer – BD + Adaptadores plásticos p/ vacutainer - BD

A armazenagem do soro sanguíneo, acondicionado em frasco apropriado e identificado⁵, foi feita em nitrogênio líquido a -196°C⁶.

Frequência de colheita das amostras

Como o objetivo foi estudar a fase gestacional e puerperal, foram realizadas colheitas em sete momentos: M0-dia zero de gestação (primeiro dia do diestro citológico), M1-1ºterço gestacional, M2-2º terço gestacional, M3-parto, M4-aleitamento, M5-desmame e M6-anestro (Tabela 1).

Tabela 1- Momentos de colheita de amostras do experimento

Momento	Determinação do momento
M0	Presença de neutrófilos na citologia vaginal, mudança abrupta de células superficiais para intermediárias e parabasais + término do comportamento de aceitação do macho, correspondendo a 8 dias pós-pico de LH
M1	20 dias após o M0 ou 28 dias pós-pico de LH
M2	20 dias após o M1 ou 48 dias pós-pico de LH
M3	Momento do parto
M4	15 dias após o parto
M5	45 dias após o parto
M6	30 dias após o desmame

⁵Criotubos - AXIGEN

⁶Botijão de N₂ líquido B2020 - CRYODIFFUSION

No momento do estro, determinado pela presença de 80% de células superficiais associada ao comportamento de aceitação do macho, foi realizada a monta natural. O primeiro dia do diestro citológico (M0) foi determinado pelo acompanhamento da citologia vaginal⁷ diária.

Dosagens laboratoriais

As dosagens de progesterona⁸, estradiol⁹, osteocalcina¹⁰, T3 total¹¹, T4 (total¹² e livre¹³) e PTH intacto¹⁴, pelo método do radioimunoensaio, foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia, do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária-UNESP - Botucatu - SP.

As determinações pelo método da quimioluminescência¹⁵¹⁶¹⁷¹⁸¹⁹ foram realizadas no Laboratório Botucatu, na cidade de Botucatu-SP.

⁷Lâminas foscas –PERFECTA + Kit hematocor – BIOLOG + Escovas endotest - INSTRUMEC

⁸progesterona-DPC-MEDLAB

⁹ estradiol-DPC-MEDLAB

¹⁰Osteocalcina-DSL

¹¹ T3 total-DPC-MEDLAB

¹² T4 total-DPC-MEDLAB

¹³ T4 livre-DPC-MEDLAB

¹⁴N-tact® PTH SP DiaSorin

¹⁵ T3 total immulite-DPC-MEDLAB

As determinações de calcitriol²⁰ e calcitonina²¹ foram realizadas no CRIESP em São Paulo-SP.

As determinações de fósforo²², cálcio total²³, proteínas totais²⁴, albumina²⁵ e fosfatase alcalina²⁶ foram realizadas no Serviço de Laboratório Clínico da PUC-MINAS Campus de Poços de Caldas.

A análise estatística programada foi executada na PUC-MINAS Campus de Poços de Caldas.

Método do radioimunoensaio

A técnica de radioimunoensaio consiste em um método de competição entre a amostra e anticorpo(s) específico(s) marcado (s) com I¹²⁵, seguida de contagem imediata da porção marcada radioativamente em contador gama.

¹⁶ T3 livre immulite-DPC-MEDLAB

¹⁷ T4 total immulite-DPC-MEDLAB

¹⁸ T4 livre immulite-DPC-MEDLAB

¹⁹ T4 canino immulite-DPC-MEDLAB

²⁰ 1,25 dihidroxivitamina D-DIASORIN

²¹ calcitonina-DPC-MEDLAB

²² Fósforo - ANALISA Diagnóstica S.A.

²³ Cálcio - ANALISA Diagnóstica S.A.

²⁴ Proti A/G CELM Cia Equipadora de Laboratórios Modernos

²⁵ Proti A/G CELM Cia Equipadora de Laboratórios Modernos

²⁶ Fosfatase alcalina cinética otimizada - CELM Cia Equipadora de Laboratórios Modernos

Método da quimioluminescência

O método consiste na competição entre soro e anticorpo ligante na fase sólida, seguida de lavagem do excesso; o anti-ligante e a fosfatase alcalina são então introduzidos para retirar o anticorpo ligante. O substrato quimioluminescente é hidrolizado em presença de fosfatase alcalina, gerando um composto instável e a luz resultante medida automaticamente.

Dosagem de fósforo sérico

Esta dosagem foi feita utilizando-se *kit* comercial²⁷, através de método colorimétrico, baseado na reação do fósforo inorgânico com molibdato de amônio, na presença de ácido sulfúrico formando um complexo de fosfomolibdato de amônio. Por ação da hidroxilamina em meio alcalino, o complexo é reduzido a azul de molibdênio, cuja absorbância foi lida em espectrofotômetro ²⁸ a 650nm.

²⁷ Fósforo - ANALISA Diagnóstica S.A.

²⁸ Spectronic 88 – CELM Cia Equipadora de Laboratórios Modernos

Dosagem de cálcio total sérico

Esta dosagem foi feita utilizando-se *kit* comercial²⁹, através de método colorimétrico, baseado na formação de um complexo violeta resultante da reação do cálcio com a o-cresolftaleína complexona, lido em espectrofotômetro a 570 nm.

Dosagem de proteínas totais séricas e albumina sérica

A dosagem das proteínas séricas foi feita utilizando-se *kit* comercial³⁰ baseado no método colorimétrico de biureto, pelo qual as proteínas reagem com o íon cúprico, formando complexo violeta lido em espectrofotômetro a 540nm.

A dosagem da albumina sérica foi feita utilizando-se o mesmo *kit* comercial, baseado no método colorimétrico do verde de bromocresol, pelo qual a albumina reage com a forma aniônica do corante. O aumento da absorbância do branco de reativo lido em espectrofotômetro a 625nm neste *kit* é proporcional a albumina presente.

²⁹ Cálcio - ANALISA Diagnóstica S.A.

³⁰ Proti A/G CELM Cia Equipadora de Laboratórios Modernos

Dosagem da fosfatase alcalina

Esta dosagem foi feita utilizando-se *kit* comercial³¹, que se baseia na hidrólise do p-nitro-fenilfosfato pela fosfatase alcalina, onde a velocidade da reação é medida a 405 nm.

Análise Estatística

A análise estatística consistiu no estudo de possíveis associações entre as variáveis estudadas, com a construção do diagrama de dispersão entre as variáveis de interesse e o cálculo da medida de relação linear entre elas, dada pelo coeficiente de correlação linear amostral de Pearson (Zar, 1996), juntamente com a significância (valor de p) associada a tal correlação.

Foi feita análise multivariada de medidas repetidas para comparação, em média, entre os pares de momentos da avaliação. Para variáveis nas quais não se observaram condições de normalidade e/ou igualdade de variâncias em cada momento, foi utilizado o teste *t de Student*, visando comparação entre momentos.

³¹ Fosfatase alcalina cinética otimizada - CELM Cia Equipadora de Laboratórios Modernos

Foram montadas curvas de acontecimentos das variáveis de acordo com os períodos preestabelecidos de colheita das amostras. Para cada variável observada no experimento foram apresentadas as estatísticas descritivas de média e desvio padrão amostral.

Para todas as variáveis testadas, a variação dos valores dos testes intra-ensaio não foi superior a 5%. As precisões intra-ensaio foram determinadas pela repetição de 10% das amostras e a precisão inter-ensaio com a utilização de um "pool" de amostras.

Exceções foram feitas a variáveis que apresentaram resultados abaixo do limite de detecção do método, em que se tornou impossível determinar média, desvio padrão e montar curvas.

Resultados

Tempo de gestação

O tempo médio de gestação, contado após o início do diestro citológico (M0) foi de 58 dias (tabela 2).

Tabela 2 - tempo de gestação pós diestro citológico em dias

CADELA	TEMPO DE GESTAÇÃO PÓS DIESTRO CITOLÓGICO (DIAS)
1	58
2	58
3	58
4	59
5	57
6	57
7	59
8	58
9	60
10	56
MÉDIA	58

PTH intacto sérico

Houve diferença estatística entre M0 e M1 (tabela 3).

Tabela 3 - valores séricos de PTH pelo método do radioimunoensaio e analisados estatisticamente pelo teste *T de Student*

Cadelas	M0 ^{a*}	M1 ^a	M2	M3	M4	M5	M6
1	66,8	21,2	85,8	58	28,8	44,2	73,1
2	57,2	20,7	28,9	89,1	33	32,6	34,9
3	39,9	33,4	68,5	239	45,5	54,2	114,9
4	161,1	68,8	33,4	49,9	21,6	44,2	122,3
5	102,6	37,6	41,7	62,8	20,3	54,2	92,7
6	49,2	30,1	37,9	22,3	86,1	102,6	208,4
7	106,1	30,1	66,3	72,7	15	31,2	44,5
8	16,8	46,7	30,5	83,9	203,7	75,6	53
9	56,8	27,4	23,1	115,5	122,7	75,6	15
10	26,1	15	65,4	46,8	50,5	35,6	15
Média	68,2	33,1	48,1	84	62,7	55	77,4
Desvio Padrão	43,6	15,5	21,4	60,2	59,9	23,1	59,7

* Letras iguais representam diferença entre os momentos

(teste *t de Student*). $p < 0,05$.

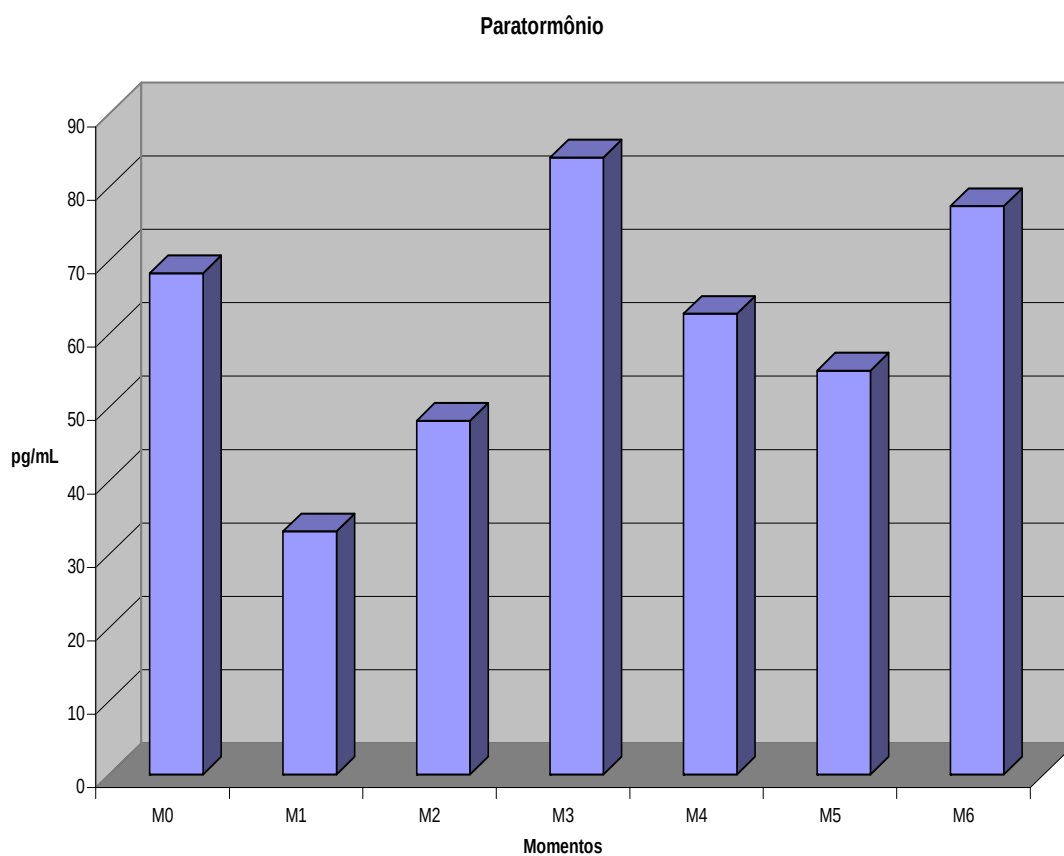


FIGURA 5: concentrações séricas de paratormônio (pg/dL) pelo radioimunoensaio durante os momentos, Botucatu-2004

M0-Pico de LH+8dias, M1-28 dias pós-LH, M2-48 dias pós-LH, M3-parto, M4-15 dias pós-parto, M5-45 dias pós-parto, M6-75 dias pós-parto

Osteocalcina sérica

Não foram observadas diferenças entre os momentos de colheitas de amostras e como ocorreram valores abaixo do limite de detecção, não foi possível estabelecer curva de acontecimento (tabela 4).

Tabela 4 - valores séricos de osteocalcina pelo método do radioimunoensaio analisados pelo teste *T de Student*

Cadelas	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
1	1,48	<0,1	<0,1	1,1	1,1	1,1	1,1
2	1,48	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
3	1,1	1,1	1,1	1,1	<0,1	<0,1	<0,1
4	1,1	1,1	<0,1	1,1	1	1,1	1,1
5	1,1	1,1	1,1	<0,1	<0,1	1,1	1,1
6	1,1	1,1	1,1	1,4	<0,1	1,1	1,1
7	1,1	<0,1	1	1,1	1,1	1,1	<0,1
8	1,1	1,2	1,1	1,1	1,1	<0,1	<0,1
9	1,1	<0,1	1,1	1,1	1,1	1	1,6
10	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,3
Média	1,1	1,1	1,0	1,1	1,0	1,0	1,2
Desvio Padrão	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Calcitonina sérica

Não foram observadas diferenças entre os momentos de colheitas de amostras (tabela 5).

Tabela 5 - valores séricos de calcitonina pelo método do radioimunoensaio e analisados estatisticamente pelo teste *T de Student*

Cadelas	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
1	11	11	12	13	18	20	22
2	11	11	12	14	18	20	16
3	11	12	12	11	15	14	11
4	11	11	12	16	14	15	11
5	11	11	20	20	20	11	11
6	11	11	11	15	11	11	11
7	11	15	15	15	15	15	15
8	11	12	12	20	20	12	12
9	11	11	12	12	12	12	11
10	12	10	12	11	11	11	11
Média	11,1	11,5	13	14,7	15,4	14,1	13,1
Desvio Padrão	0,3	1,4	2,7	3,3	3,5	3,5	3,6

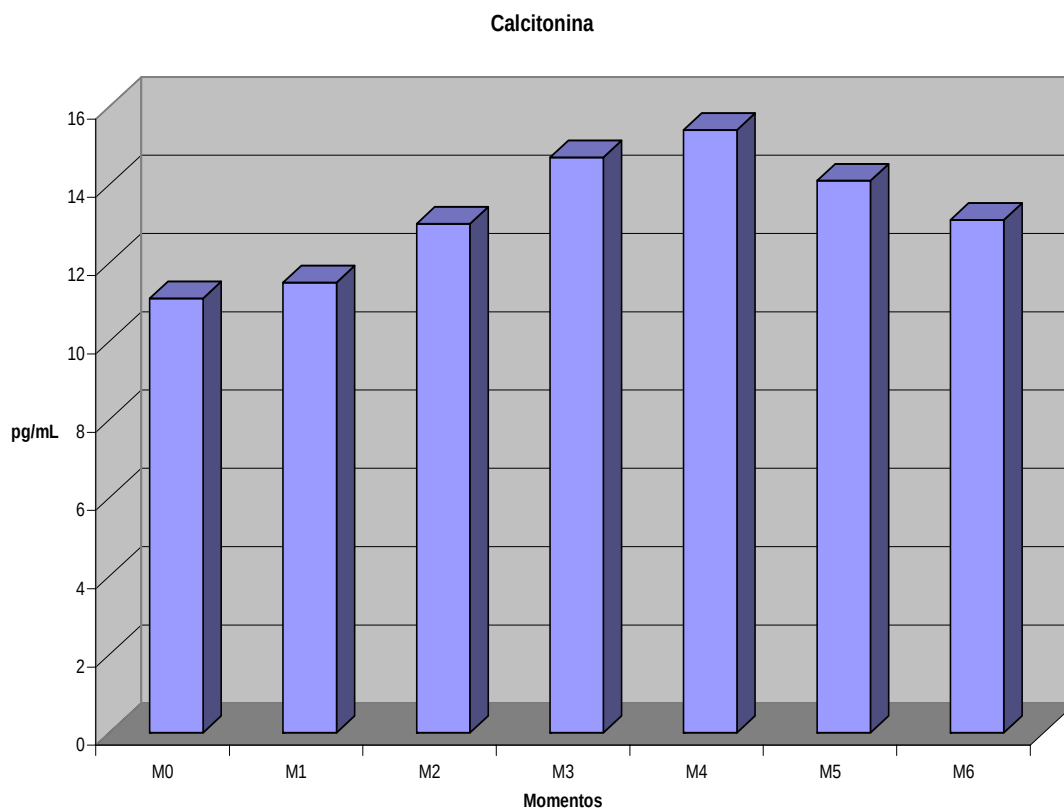


FIGURA 6: concentrações séricas de calcitonina (pg/dL) pelo radioimunoensaio durante os momentos, Botucatu-2004

M0-Pico de LH+8dias, M1-28 dias pós-LH, M2-48 dias pós-LH, M3-parto, M4-15 dias pós-parto, M5-45 dias pós-parto, M6-75 dias pós-parto

Progesterona sérica

Foram encontradas diferenças entre os momentos M0 e M1, M1 e M2, M2 e M3, M3 e M4, M6 e M0 (tabela 6).

Tabela 6 - valores séricos de progesterona pelo método do radioimunoensaio e analisados estatisticamente pelo teste *T de Student*

Cadelas	M0 ^{g,a *}	M1 ^{a,b}	M2 ^{b,c}	M3 ^{c,d}	M4 ^d	M5	M6 ^g
1	1	11,6	15,7	16,4	2	3,2	5,4
2	1	10,4	15,2	16,4	2,9	3,6	7,6
3	1	8,4	15,1	4,7	1,5	2,3	4,6
4	1	9	17,2	15,3	2,6	3,0	3,5
5	1	8,8	14,3	14,7	2,2	2,2	2,6
6	1	9,1	19,8	16,4	9,1	7,4	6,0
7	1	9,1	15,2	15,8	7	6,8	1,3
8	1	8,4	15,2	2,6	6,5	7,5	5,9
9	1	8,1	15	3,5	7,8	8,2	17,0
10	1	9,9	14,6	2,3	7,5	6,4	4,2
Média	1	9,3	15,7	1,08	4,9	5,1	5,8
Desvio Padrão	2 ⁻⁹	1 ⁻¹	2 ⁻¹	7 ⁻¹	3 ⁻¹	2 ⁻¹	4 ⁻¹

* Letras iguais representam diferença entre os momentos (teste *t de Student*). $p < 0,05$.

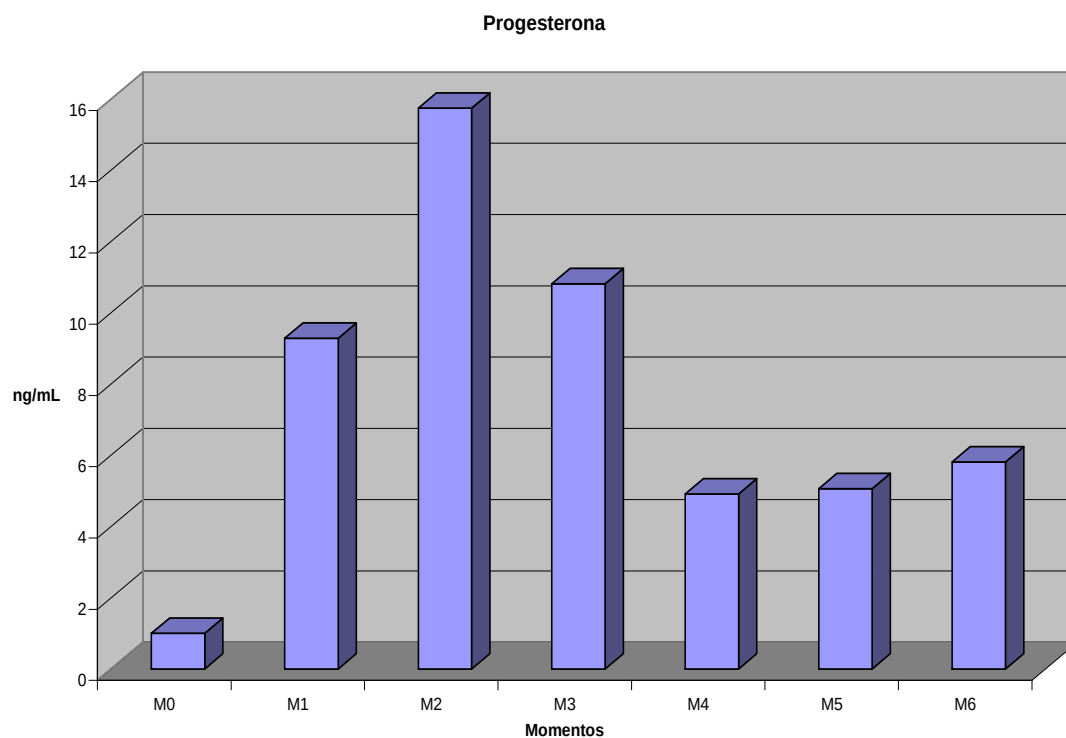


FIGURA 7: concentrações séricas de progesterona (ng/mL) pelo radioimunoensaio durante os momentos, Botucatu-2004

M0-Pico de LH+8dias, M1-28 dias pós-LH, M2-48 dias pós-LH, M3-parto, M4-15 dias pós-parto, M5-45 dias pós-parto, M6-75 dias pós-parto

Estradiol sérico

Foram encontradas diferenças entre os momentos M0 e M1, M3 e M4, M6 e M0 (tabela 7).

Tabela 7 - valores séricos de estradiol pelo método do radioimunoensaio e analisados estatisticamente pelo teste *T de Student*

Cadelas	M0 ^{g,a *}	M1 ^a	M2	M3 ^d	M4 ^d	M5	M6 ^g
1	3,4	4,2	1,6	1,9	1,2	1,2	1,2
2	2,0	4,7	1,4	1,0	1,8	1,7	0,9
3	4,8	1,0	0,5	1,1	0,4	0,5	0,7
4	4,5	3,3	0,7	1,0	0,4	0,4	0,6
5	4,7	1,5	1,0	1,6	0,6	0,3	0,2
6	3,4	1,6	1,5	1,3	1,0	1,0	0,2
7	4,3	1,6	4,2	1,4	0,1	0,3	0,2
8	6,5	1,3	1,2	1,2	0,1	0,1	1,0
9	4,4	1,2	1,0	1,3	0,7	0,1	0,1
10	4,9	1,7	0,6	0,8	0,9	0,8	0,2
Média	4,3	2,2	1,3	1,2	0,8	0,7	0,5
Desvio Padrão	1,1	1,3	1,0	0,3	0,4	0,5	0,4

* Letras iguais representam diferença entre os momentos (teste *t de Student*). $p < 0,05$.

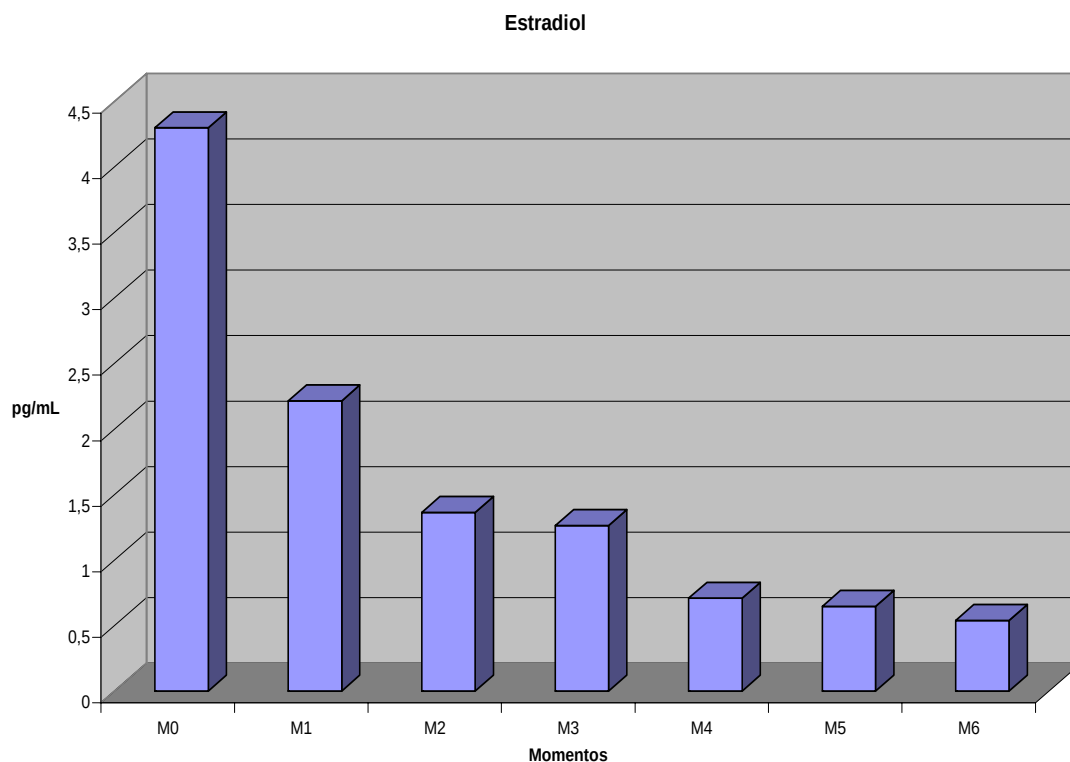


FIGURA 8: concentrações séricas de estradiol (pg/mL) pelo radioimunoensaio durante os momentos, Botucatu-2004

M0-Pico de LH+8dias, M1-28 dias pós-LH, M2-48 dias pós-LH, M3-parto, M4-15 dias pós-parto, M5-45 dias pós-parto, M6-75 dias pós-parto

T3 total sérico

Foram encontradas diferenças entre os momentos M2 e M3 pelo método do radioimunoensaio (tabela 8).

Observou-se que as cadelas 3, 5, 6 e 9 elevaram a média no M3 e as cadelas 1, 4, 5, 8 e 10 elevaram a média no M4.

Tabela 8 - valores séricos de T3 total pelo método do radioimunoensaio e analisados estatisticamente pelo teste *T de Student*

Cadelas	M0*	M1	M2 ^c	M3 ^c	M4	M5	M6
1	90,3	120,4	29,5	65,8	288,6	101,2	81,1
2	103,1	152,0	39,3	66,8	75,0	54,3	34,4
3	91,3	41,5	90,5	220,4	33,9	74,2	449,4
4	97,2	128,6	24,4	62,2	485,2	95,6	89,2
5	75,6	67,1	66,9	314,7	233,4	255,3	363,4
6	94,1	70,3	88,0	541,2	84,1	95,3	213,0
7	101,3	116,2	42,9	57,5	73,1	75,1	74,1
8	110,1	79,1	139,6	79,2	202,2	96,2	52,0
9	100,7	93,8	50,9	507,5	51,2	52,6	62,0
10	107,5	132,2	64,5	67,9	219,3	200,2	32,9
Média	97,1	100,1	63,6	198,3	174,5	110,0	145,1
Desvio Padrão	9,9	35,1	34,9	191,9	141,0	65,6	148,1

* Letras iguais representam diferença entre os momentos (teste *t de Student*). $p < 0,05$.

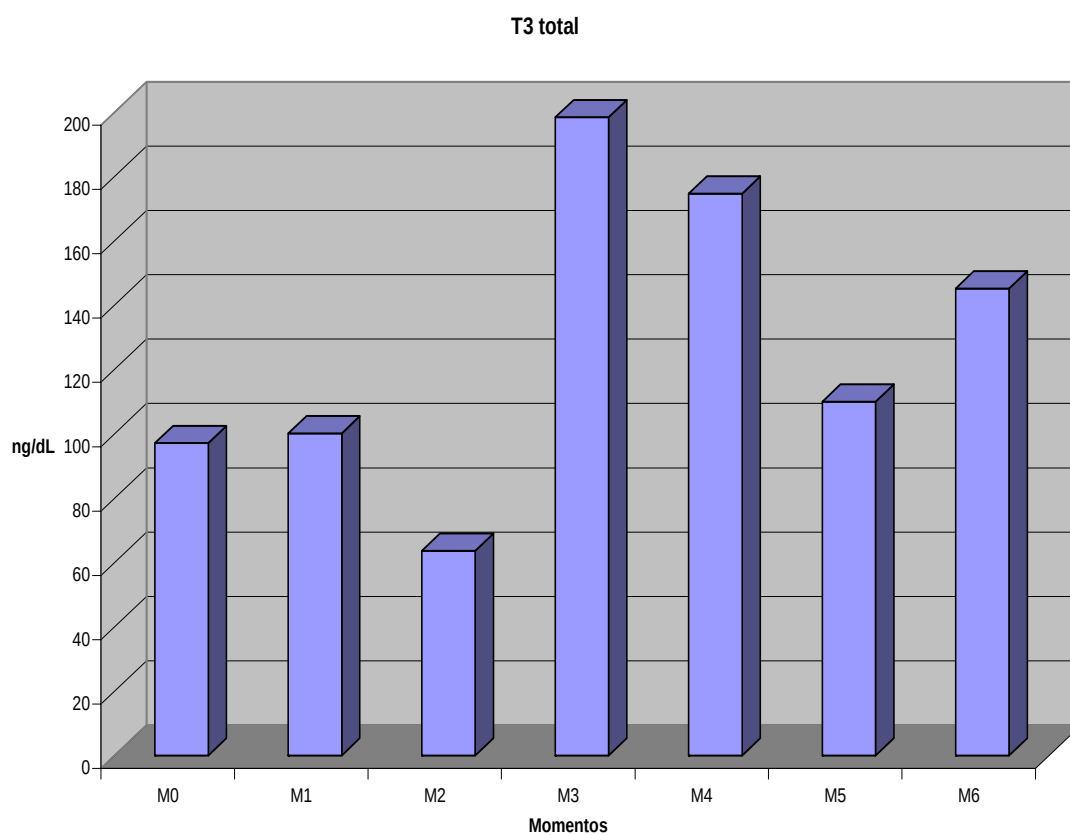


FIGURA 9: concentrações séricas de T3 total (ng/dL) pelo radioimunoensaio durante os momentos, Botucatu-2004

M0-Pico de LH+8dias, M1-28 dias pós-LH, M2-48 dias pós-LH, M3-parto, M4-15 dias pós-parto, M5-45 dias pós-parto, M6-75 dias pós-parto

Pelo método da quimioluminescência foram encontradas diferenças entre os momentos M0 e M1, M1 e M2 (tabela 9).

Tabela 9 - valores séricos de T3 total pelo método da quimioluminescência e analisados estatisticamente pelo teste *T de Student*

Cadelas	M0 ^{a *}	M1 ^{a,b}	M2 ^b	M3	M4	M5	M6
1	<40	47,8	<40	<40	<40	<40	<40
2	44,5	53,7	<40	<40	<40	<40	<40
3	<40	49,1	<40	<40	<40	<40	<40
4	<40	55,6	<40	<40	<40	<40	<40
5	<40	50,7	<40	<40	<40	<40	<40
6	<40	46,6	50,5	<40	<40	<40	<40
7	<40	50,3	<40	<40	<40	<40	<40
8	42	48,4	<40	<40	<40	<40	<40
9	41,9	50,8	<40	<40	<40	<40	<40
10	48,6	49,1	<40	<40	<40	<40	<40
Média		50,2					
Desvio Padrão		2,7					

* Letras iguais representam diferença entre os momentos (teste *t de Student*). $p < 0,05$.

T4 total sérico

O T4 total pelo RIA apresentou diferenças entre os momentos M0 e M1), M6 e M0 (tabela 11).

Tabela 11 - valores séricos de T4 total pelo método do radioimunoensaio e analisados estatisticamente pelo teste *T de Student*

Cadelas	M0 ^{g,a} *	M1 ^a	M2	M3	M4	M5	M6 ^g
1	3,0	3,5	4,8	1,6	4,3	1,2	0,9
2	2,6	3,3	1,3	2,5	2,2	2,0	2,0
3	2,9	4,6	1,7	0,9	2,8	1,9	1,9
4	0,5	2,8	3,7	3,9	2,7	2,3	1,9
5	1,4	2,8	4,9	3,3	1,3	0,8	0,7
6	2,9	1,6	1,6	3,6	0,2	0,3	1,4
7	1,4	2,4	2,4	3,4	1,2	1,1	1,0
8	3,7	5,8	1,7	5,2	0,4	0,4	0,4
9	2,8	3,1	5,0	2,8	1,5	1,0	0,6
10	3,2	2,6	2,7	1,5	1,8	1,6	1,8
Média	2,4	3,2	2,9	2,8	1,8	1,2	1,2
Desvio Padrão	0,9	1,1	1,5	1,2	1,2	0,6	0,6

* Letras iguais representam diferença entre os momentos (teste *t de Student*). $p < 0,05$.

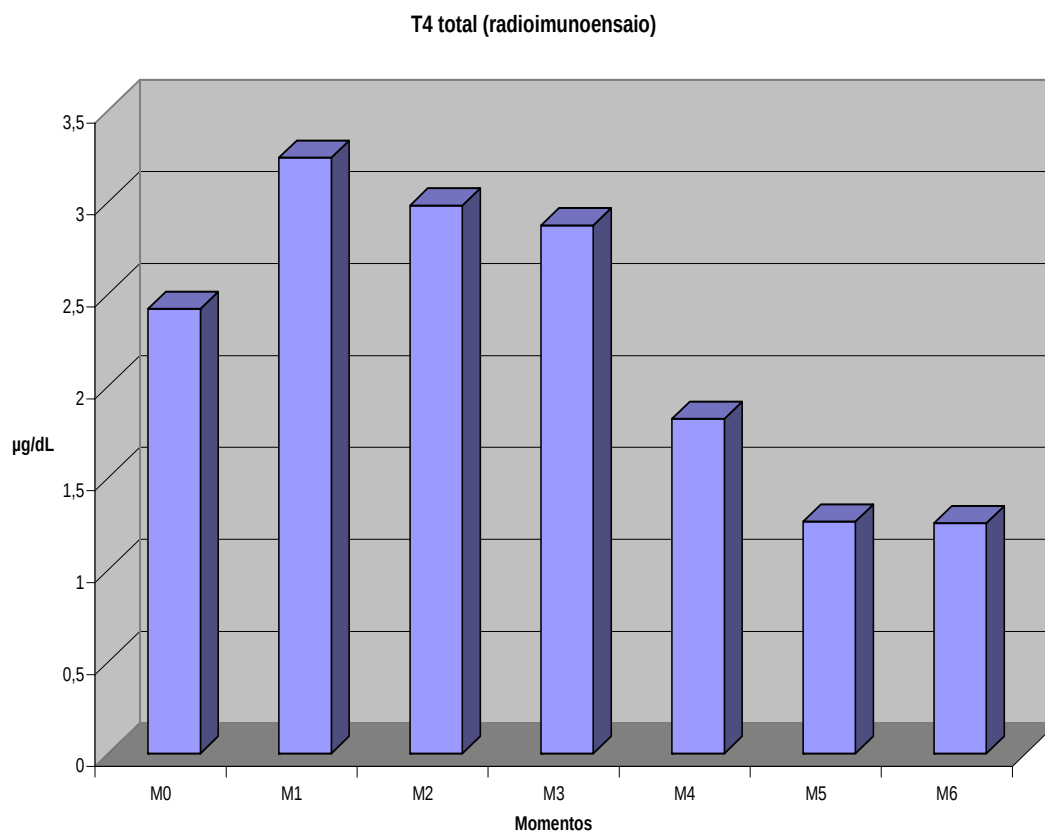


FIGURA 10: concentrações séricas de T4 total ($\mu\text{g/dL}$) pelo radioimunoensaio durante os momentos, Botucatu-2004

M0-Pico de LH+8dias, M1-28 dias pós-LH, M2-48 dias pós-LH, M3-parto, M4-15 dias pós-parto, M5-45 dias pós-parto, M6-75 dias pós-parto

Pelo método da quimioluminescência entre os momentos M1 e M2, M4 e M5, M5 e M6 (tabela 12).

Tabela 12 - valores séricos de T4 total pelo método da quimioluminescência e analisados estatisticamente pelo teste *T de Student*

Cadelas	M0*	M1 ^b	M2 ^b	M3	M4 ^e	M5 ^{e,f}	M6 ^f
1	1,3	1,1	1	1,1	<1	<1	<1
2	1,6	1,2	<1	1,1	<1	<1	1,2
3	1	1,3	1,3	<1	1,1	<1	1,2
4	1,1	1,3	1,2	1	<1	<1	1,2
5	1,1	1,2	<1	1	1,1	<1	1
6	1,1	1,4	1,1	<1	1	<1	1
7	1	1,3	1,1	1,5	1,2	1	1,2
8	1,4	1,4	1,1	1	1,2	1	1,1
9	1,3	1,1	1	<1	1,1	<1	<1
10	1,4	1,1	1,1	<1	1,1	<1	<1
Média	1,2	1,2	1,1	1,1	1,1	1,0	1,1
Desvio Padrão	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,0	0,1

* Letras iguais representam diferença entre os momentos (teste *t de Student*). $p < 0,05$.

T4 livre sérico

O T4 livre pelo RIA apresentou diferenças entre M1 e M2, M3 e M4, M6 e M0 (tabela 13).

Tabela 13 - valores séricos de T4 livre pelo método do radioimunoensaio e analisados estatisticamente pelo teste *T de Student*

Cadelas	M0 ^g *	M1 ^b	M2 ^b	M3 ^d	M4 ^d	M5	M6 ^g
1	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
2	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
3	0,4	0,4	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2
4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
5	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
6	0,4	0,4	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
7	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
8	0,4	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
9	0,4	0,4	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
10	0,4	0,4	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2
Média	0,4	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
Desvio Padrão	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

* Letras iguais representam diferença entre os momentos (teste *t de Student*). $p < 0,05$.

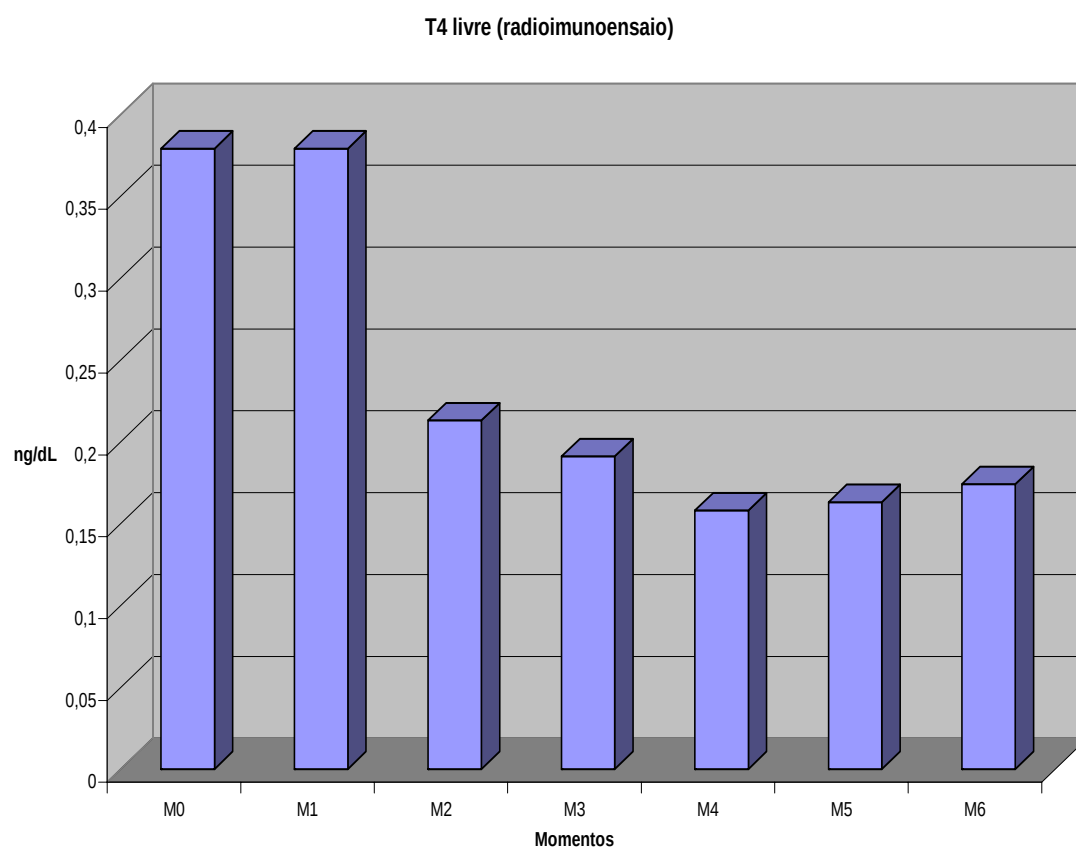


FIGURA 11: concentrações séricas de T4 livre (ng/dL) pelo radioimunoensaio durante os momentos, Botucatu-2004

M0-Pico de LH+8dias, M1-28 dias pós-LH, M2-48 dias pós-LH, M3-parto, M4-15 dias pós-parto, M5-45 dias pós-parto, M6-75 dias pós-parto

Pela quimioluminescência apresentou diferenças entre M0 e M1, M1 e M2, M3 e M4, M6 e M0 (tabela 14).

Tabela 14 - valores séricos de T4 livre pelo método da quimioluminescência e analisados estatisticamente pelo teste *T de Student*

Cadelas	M0 ^{g,a*}	M1 ^{a,b}	M2 ^b	M3 ^d	M4 ^d	M5	M6 ^g
1	1,4	1,4	0,8	0,8	0,9	0,7	0,9
2	1,3	1,4	0,7	0,8	1	0,9	0,9
3	1,2	1,5	0,8	0,7	0,8	0,8	0,9
4	1,2	1,3	0,9	0,9	1	0,8	0,8
5	1,2	1,5	0,8	0,9	1	1	0,9
6	1,4	1,4	0,8	0,7	1	1	0,8
7	1,5	1,4	0,8	0,7	0,9	0,8	1
8	1,4	1,4	0,9	0,7	0,8	0,9	0,8
9	1,2	1,3	0,8	0,7	0,8	0,8	0,8
10	1,2	1,3	0,9	0,7	0,7	0,8	0,9
Média	1,3	1,4	0,8	0,8	0,9	0,9	0,9
Desvio Padrão	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

* Letras iguais representam diferença entre os momentos (teste *t de Student*). $p < 0,05$.

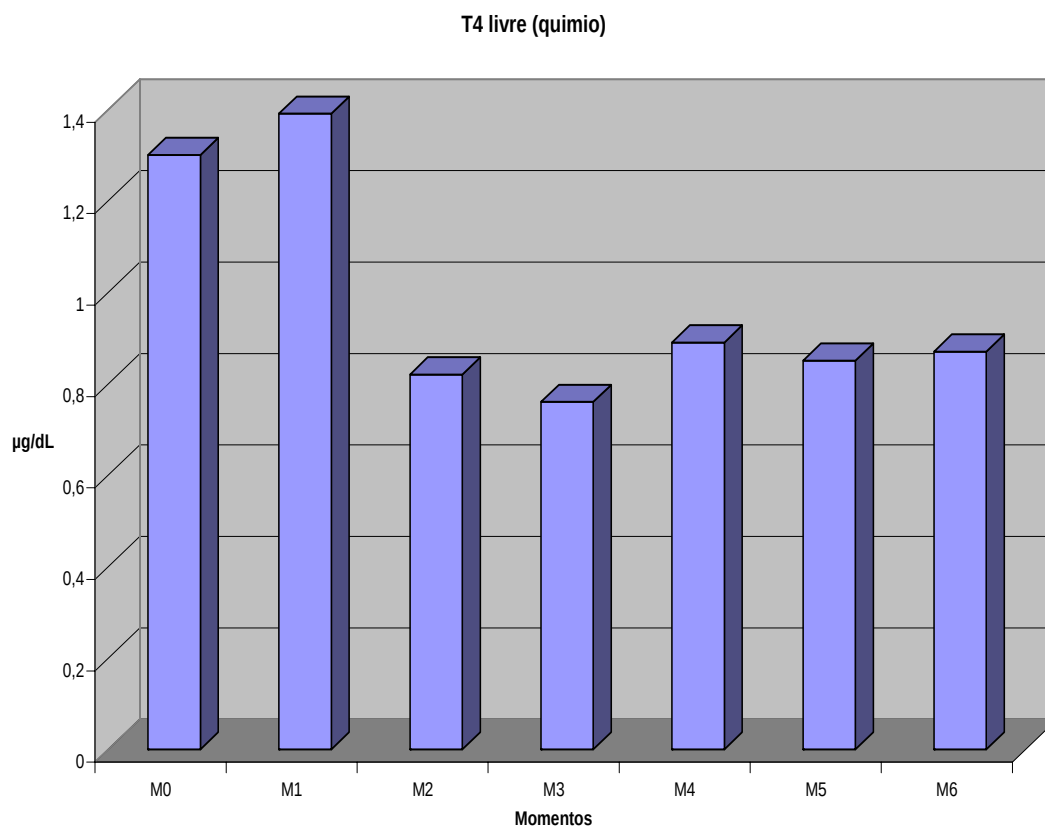


FIGURA 12: concentrações séricas de T4 livre (ng/dL) pela quimioluminescência durante os momentos, Botucatu-2004

M0-Pico de LH+8dias, M1-28 dias pós-LH, M2-48 dias pós-LH, M3-parto, M4-15 dias pós-parto, M5-45 dias pós-parto, M6-75 dias pós-parto

T4 canino

O T4 canino pela quimioluminescência apresentou diferenças entre M0 e M1, M2 e M3, M6 e M0 (tabela 15).

Tabela 15 - valores séricos de T4 canino pelo método da quimioluminescência e analisados estatisticamente pelo teste *T de Student*

Cadelas	M0 ^{g,a} *	M1 ^a	M2 ^c	M3 ^c	M4	M5	M6 ^g
1	1,2	1,2	1	1	0,5	0,8	0,6
2	1,3	1,2	1,1	1	0,7	0,8	1
3	1,2	1,1	1,1	0,6	1,1	1	1
4	1,4	1,1	1	1	0,5	0,6	1
5	1,2	1,1	1,2	1,1	1,2	1	1,1
6	1,3	1,2	1,1	1	1,1	1	1,2
7	1,3	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
8	1,5	1,2	1	0,8	1	1	1,1
9	1,2	1,2	1,1	0,8	1	1,1	1
10	1,3	1	1,2	0,8	1	1	0,5
Média	1,3	1,1	1,1	0,9	0,9	0,9	1,0
Desvio Padrão	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2

* Letras iguais representam diferença entre os momentos

(teste *t de Student*). $p < 0,05$.

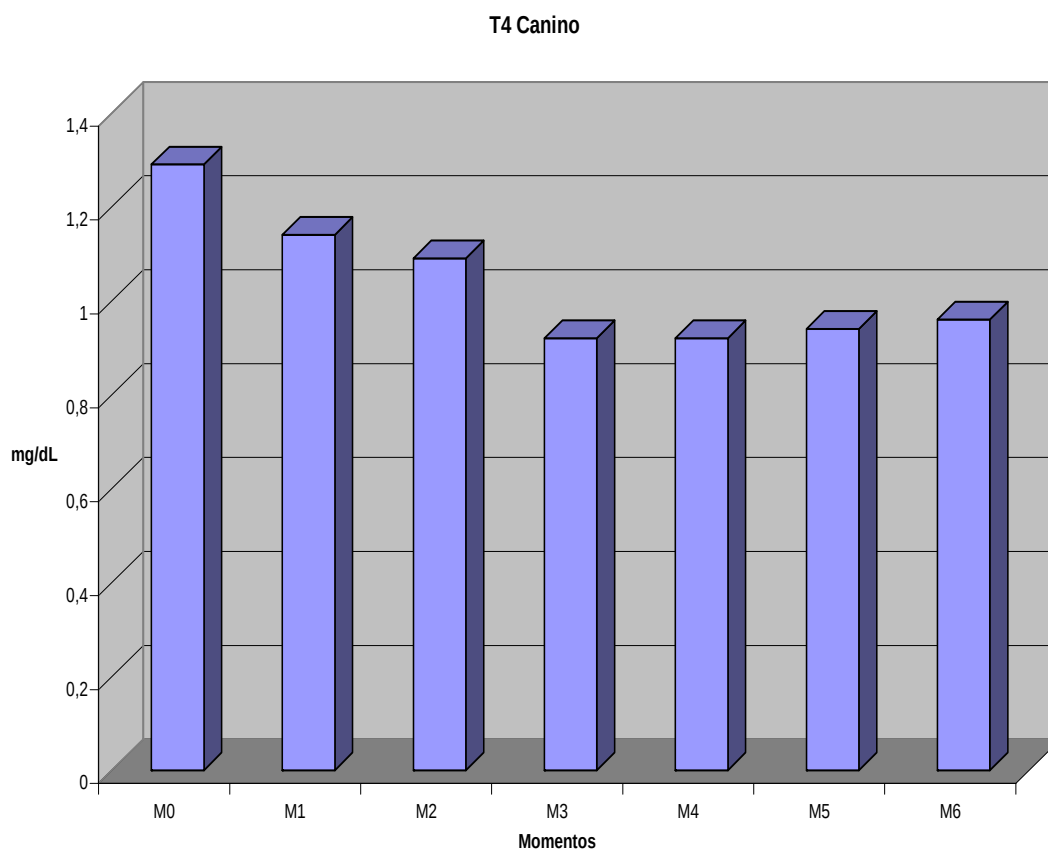


FIGURA 13: concentrações séricas de T4 canino ($\mu\text{g/dL}$) pela quimioluminescência durante os momentos, Botucatu-2004

M0-Pico de LH+8dias, M1-28 dias pós-LH, M2-48 dias pós-LH, M3-parto, M4-15 dias pós-parto, M5-45 dias pós-parto, M6-75 dias pós-parto

1,25 dihidroxivitamina D (calcitrol)

A 1,25dihidroxivitamina D pelo RIA apresentou diferença entre M0 e M1 (tabela 16).

Tabela 16 - valores séricos de calcitriol pelo método do radioimunoensaio e analisados estatisticamente pelo teste *T de Student*

Cadelas	M0 ^{a*}	M1 ^a	M2	M3	M4	M5	M6
1	28	32	33	25	26	28	30
2	20	25	25	25	32	25	25
3	25	26	23	24	30	30	25
4	25	25	30	30	30	26	26
5	25	26	25	30	30	30	25
6	25	29	30	30	30	25	25
7	25	25	26	30	30	25	25
8	25	30	30	33	32	30	30
9	25	25	25	25	25	30	25
10	32	30	25	30	30	30	32
Média	26	27	27	28	30	28	27
Desvio Padrão	3,0	2,7	3,3	3,1	2,3	2,4	2,7

* Letras iguais representam diferença entre os momentos

(teste *t de Student*). $p < 0,05$.

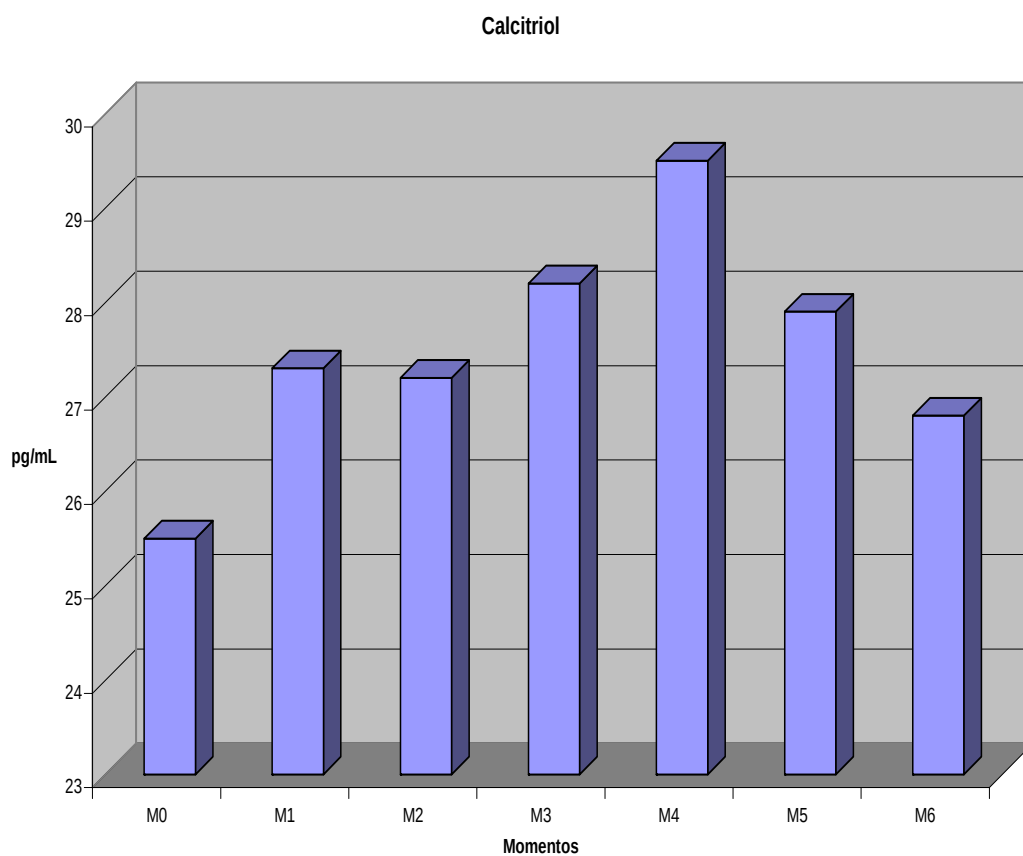


FIGURA 14: concentrações séricas de calcitriol (pg/mL) pelo radioimunoensaio durante os momentos, Botucatu-2004

M0-Pico de LH+8dias, M1-28 dias pós-LH, M2-48 dias pós-LH, M3-parto, M4-15 dias pós-parto, M5-45 dias pós-parto, M6-75 dias pós-parto

Fósforo sérico

O fósforo apresentou diferenças entre M0 e M1, M2 e M3, M3 e M4, M6 e M0 (tabela 17).

Tabela 17 - valores séricos de fósforo durante o experimento e analisados estatisticamente pelo teste *T de Student*

Cadelas	M0 ^{g,a*}	M1 ^a	M2 ^c	M3 ^{c,d}	M4 ^d	M5	M6 ^g
1	3,1	2,9	2,8	3,2	3,5	3,6	4
2	3,1	2,7	2,9	3,2	3,2	3,3	4
3	3	2,7	2,7	3	3,3	3,6	3,6
4	3	2,7	2,8	3,1	3,3	3,4	3,9
5	3	2,8	2,7	3	3,2	3,4	3,9
6	3	2,9	2,7	3	3,2	3,1	3,5
7	3,3	3,2	3,1	3,2	3,4	3,5	3,9
8	3	3,2	3,1	3	3	3,2	3,3
9	3	2,7	2,8	3,1	3,1	3,1	3,1
10	5	4,5	4,1	5,1	4,9	4,8	4,2
Média	3,3	3,0	3,0	3,3	3,4	3,5	3,7
Desvio Padrão	0,6	0,6	0,4	0,6	0,5	0,5	0,4

* Letras iguais representam diferença entre os momentos

(teste *t de Student*). $p < 0,05$.

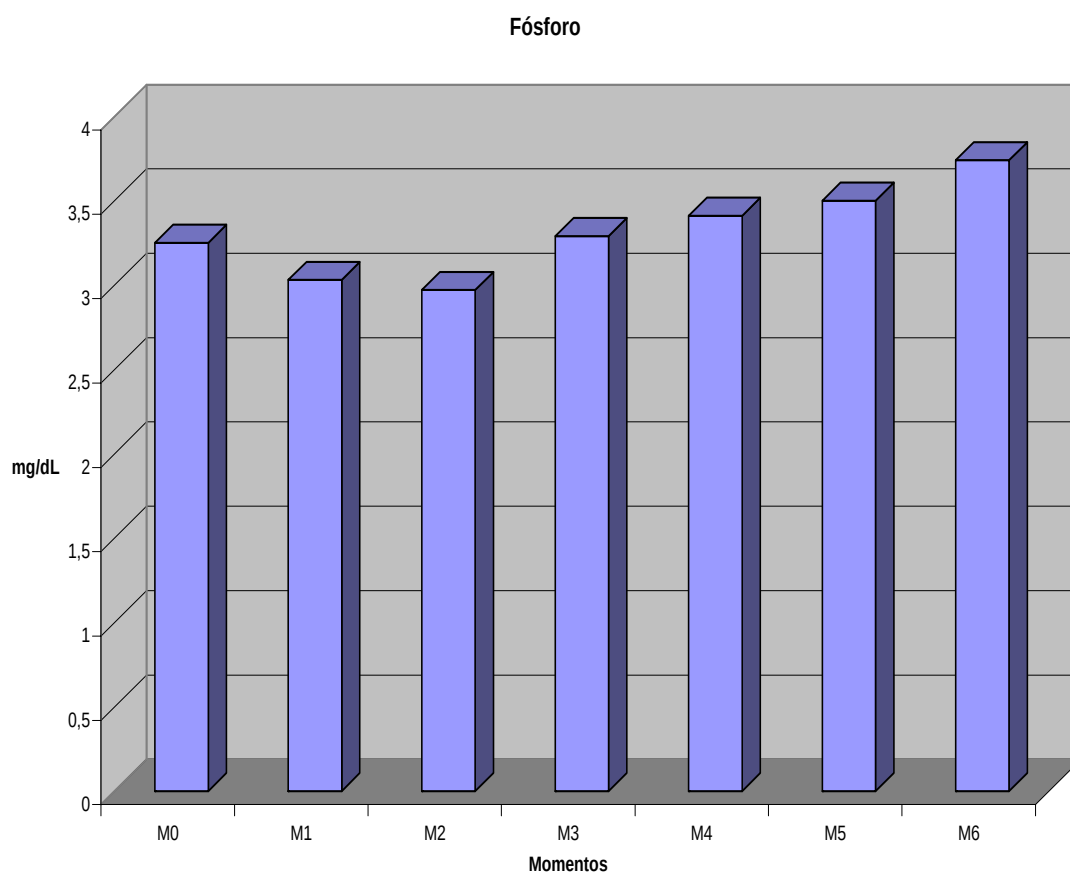


FIGURA 15: concentrações séricas de fósforo (mg/dL) durante os momentos, Botucatu-2004

M0-Pico de LH+8dias, M1-28 dias pós-LH, M2-48 dias pós-LH, M3-parto, M4-15 dias pós-parto, M5-45 dias pós-parto, M6-75 dias pós-parto

Cálcio total sérico

O cálcio total apresentou diferenças entre M0 e M1, M1 e M2, M2 e M3, M5 e M6 (tabela 18).

Tabela 18 - valores séricos de cálcio total durante o experimento e analisados estatisticamente pelo teste *T de Student*

Cadelas	M0 ^{a*}	M1 ^{a,b}	M2 ^{b,c}	M3 ^c	M4	M5 ^f	M6 ^f
1	11	9,5	9	10,2	10	9,5	11,1
2	10,3	9,2	8,6	9,1	9,9	9,5	11,1
3	10,8	9,5	8,9	10	9,9	9,2	11
4	10	9,3	8,7	9,6	9,4	9,5	10,7
5	10	9	8,5	10,3	10,1	10,3	11
6	10	9	8,5	10	10,1	9,8	10
7	11,2	9,2	9,1	10,3	10,1	10,2	11
8	9	8,5	8	10	9,9	9,2	10,5
9	9	8,9	8,9	10,2	9,9	9,4	9,6
10	11	10	9,1	9,3	9,2	9,5	10,1
Média	10,2	9,2	8,7	9,9	9,9	9,6	10,6
Desvio Padrão	0,8	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4	0,5

* Letras iguais representam diferença entre os momentos

(teste *t de Student*). $p < 0,05$.

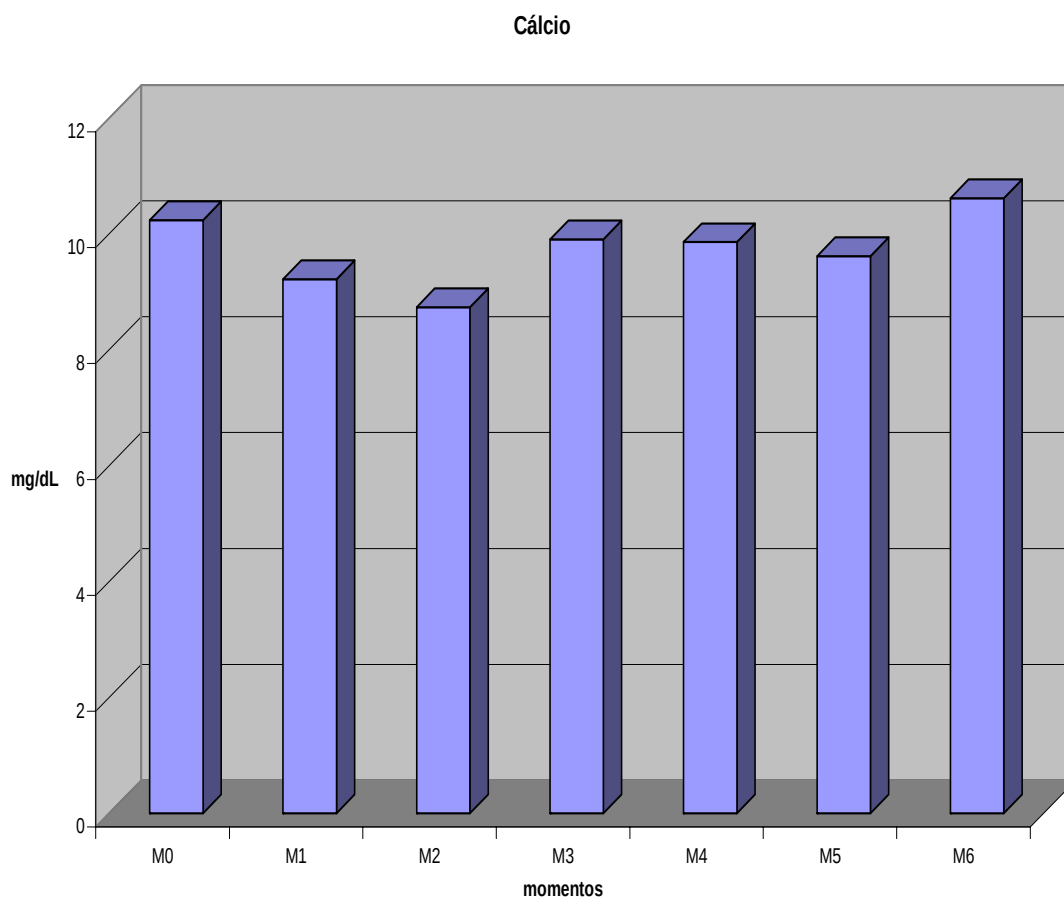


FIGURA 16: concentrações séricas de cálcio (mg/dL) durante os momentos, Botucatu-2004

M0-Pico de LH+8dias, M1-28 dias pós-LH, M2-48 dias pós-LH, M3-parto, M4-15 dias pós-parto, M5-45 dias pós-parto, M6-75 dias pós-parto

Proteínas totais séricas e albumina sérica

Na dosagem das proteínas totais foram encontradas diferenças entre M0 e M1, M1 e M2, M3 e M4, M5 e M6 (tabela 19).

Tabela 19 - valores séricos de proteínas totais durante o experimento e analisados estatisticamente pelo teste *T de Student*

Cadelas	M0 ^{a*}	M1 ^{a,b}	M2 ^b	M3 ^d	M4 ^d	M5 ^f	M6 ^f
1	6,5	6	5,5	5,4	6	6,2	7
2	6,5	5,8	5,3	5,4	5,9	6,1	7
3	6,2	5,9	5,3	5,4	6,2	6	6,9
4	6,2	5,9	5,3	5,5	6,1	6,3	6,9
5	6	6	5,3	6,2	6,3	6,2	6,9
6	6,2	6,1	6	6,5	6,3	6,2	6,5
7	7	6,3	6	6,3	6,5	6,1	6,7
8	7,2	7	6,5	7,3	7	6,5	7,2
9	7	6,5	6,2	6,1	6,1	6,1	6,3
10	7	6,5	5,5	5,2	6,5	6,8	7,1
Média	6,6	6,2	5,7	5,9	6,3	6,3	6,9
Desvio Padrão	0,4	0,4	0,4	0,7	0,3	0,2	0,3

* Letras iguais representam diferença entre os momentos (teste *t de Student*). $p < 0,05$.

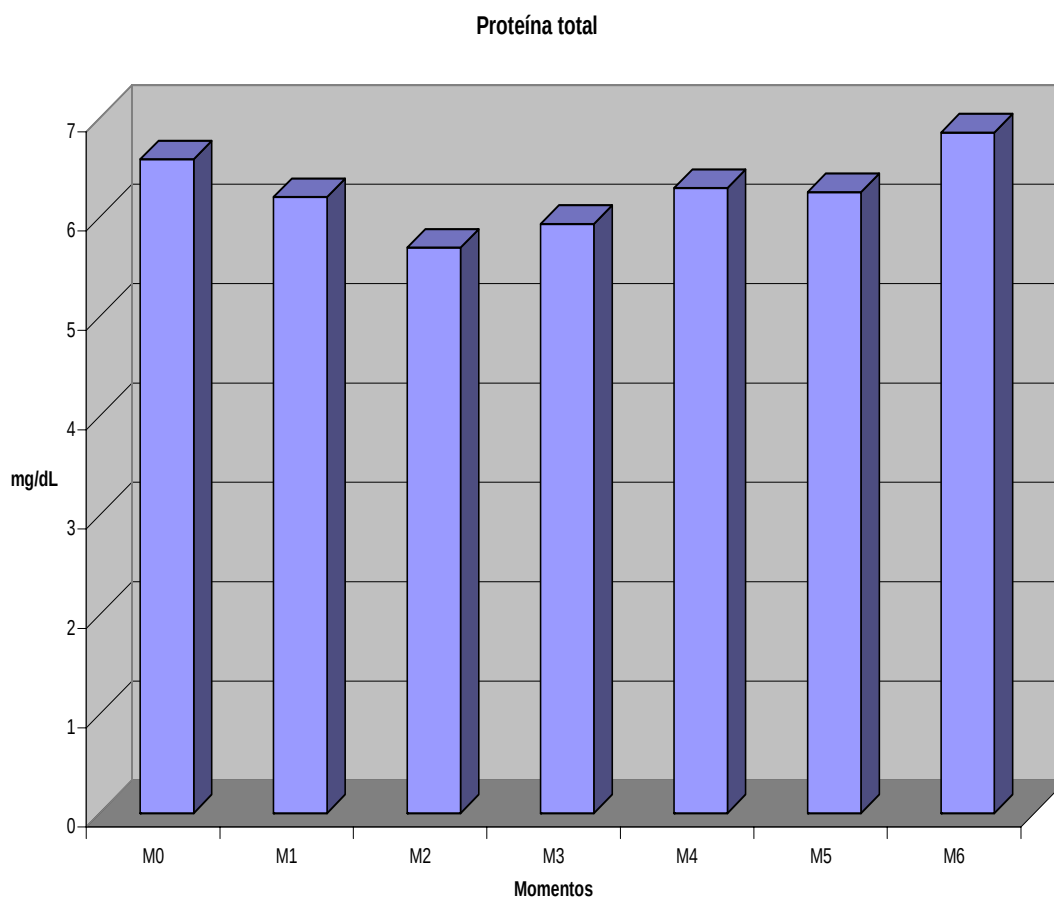


FIGURA 17: concentrações séricas de proteína total (mg/dL) durante os momentos, Botucatu-2004

M0-Pico de LH+8dias, M1-28 dias pós-LH, M2-48 dias pós-LH, M3-parto, M4-15 dias pós-parto, M5-45 dias pós-parto, M6-75 dias pós-parto

A albumina apresentou diferença entre M0 e M1, M1 e M2, M2 e M3, M3 e M4 (tabela 20).

Tabela 20 - valores séricos de albumina durante o experimento e analisados estatisticamente pelo teste *T de Student*

Cadelas	M0 ^{a*}	M1 ^{a,b}	M2 ^{b,c}	M3 ^{c,d}	M4 ^d	M5	M6
1	3,1	3,1	2,9	2,8	3,1	3	3
2	3,1	3,1	2,9	2,8	3,1	3	2,9
3	3,2	3	2,7	2,8	2,9	3,2	3
4	3	2,9	2,8	3,1	3,2	3,2	3,3
5	3	3	2,9	3,3	3,2	3,1	3,5
6	3	2,9	2,9	3,1	3,1	3	3,1
7	3,5	3,4	3	3,2	3,3	3,3	3,3
8	3,4	3,2	3	3,4	3,5	3,1	3,2
9	3	3	2,8	2,7	3	3	3
10	3,5	3,3	2,7	2,8	3,3	3,2	3,6
Média	3,2	3,1	2,9	3,0	3,2	3,1	3,2
Desvio Padrão	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2

* Letras iguais representam diferença entre os momentos (teste *t de Student*). $p < 0,05$.

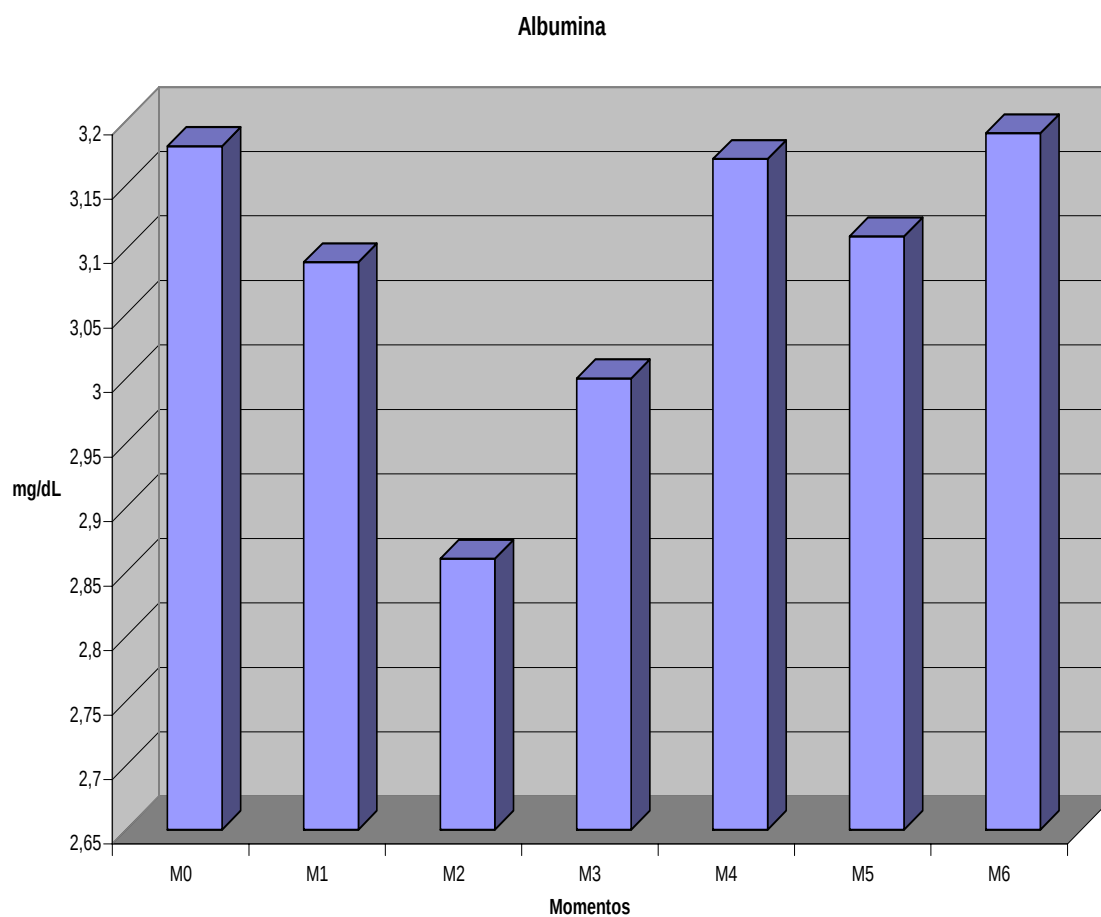


FIGURA 18: concentrações séricas de albumina (mg/dL) durante os momentos, Botucatu-2004

M0-Pico de LH+8dias, M1-28 dias pós-LH, M2-48 dias pós-LH, M3-parto, M4-15 dias pós-parto, M5-45 dias pós-parto, M6-75 dias pós-parto

Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina apresentou diferenças entre M1 e M2, M2 e M3, M3 e M4, M4 e M5, M5 e M6 (tabela 21).

Tabela 21 - valores séricos de fosfatase alcalina durante o experimento e analisados estatisticamente pelo teste *T de Student*

Cadelas	M0*	M1 ^b	M2 ^{b,c}	M3 ^{c,d}	M4 ^{d,e}	M5 ^{e,f}	M6 ^f
1	56	75	90	91	110	122	61
2	62	80	89	91	120	132	61
3	65	81	99	97	120	150	70
4	60	78	84	99	105	130	120
5	60	81	91	101	122	135	150
6	66	74	89	93	105	132	77
7	77	65	86	95	128	139	88
8	88	92	75	99	96	88	78
9	110	74	99	101	108	132	98
10	88	85	95	106	115	135	97
Média	73,2	78,5	89,7	97,3	112,9	129,5	90
Desvio Padrão	17,3	7,3	7,2	4,9	9,8	16,2	27,9

* Letras iguais representam diferença entre os momentos (teste *t de Student*). $p < 0,05$.

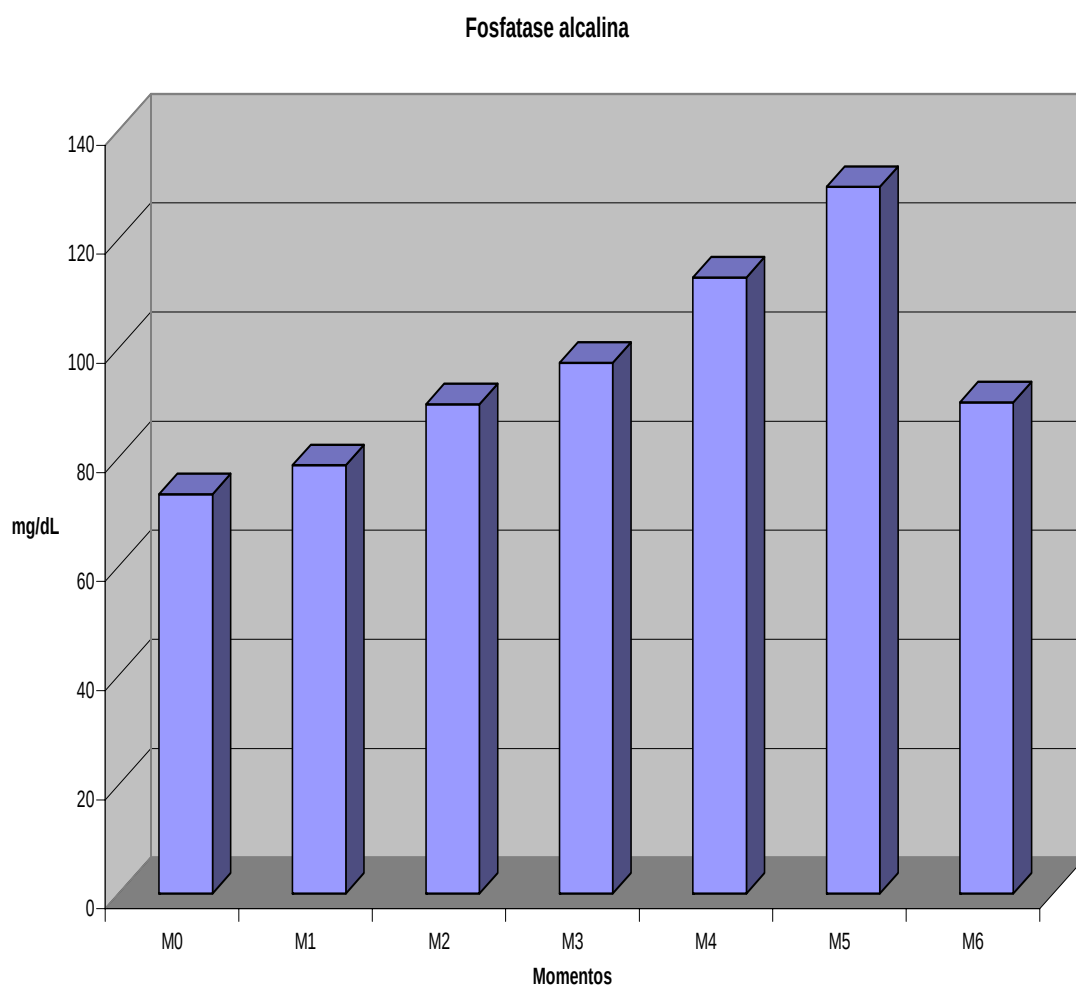


FIGURA 19: concentrações séricas de fosfatase alcalina (mg/dL) durante os momentos, Botucatu-2004

M0-Pico de LH+8dias, M1-28 dias pós-LH, M2-48 dias pós-LH, M3-parto, M4-15 dias pós-parto, M5-45 dias pós-parto, M6-75 dias pós-parto

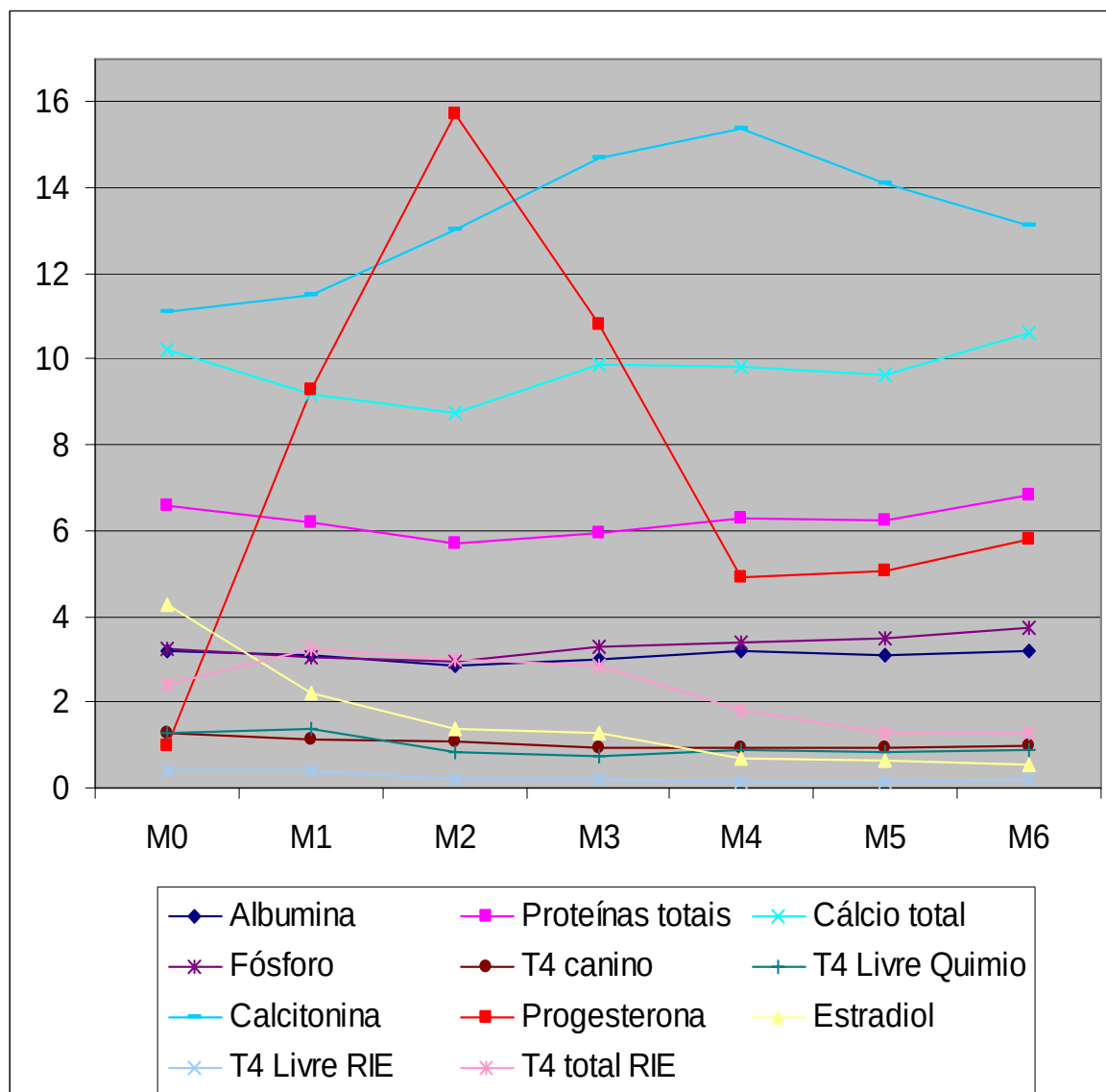


FIGURA 20: curvas de valores médios de albumina, fósforo, calcitonina, T4 livre RIE, proteínas totais, T4 canino, progesterona, T4 total RIE, cálcio total, T4 livre quimio e estradiol durante os momentos, Botucatu-2004

M0-Pico de LH+8dias, M1-28 dias pós-LH, M2-48 dias pós-LH, M3-parto, M4-15 dias pós-parto, M5-45 dias pós-parto, M6-75 dias pós-parto

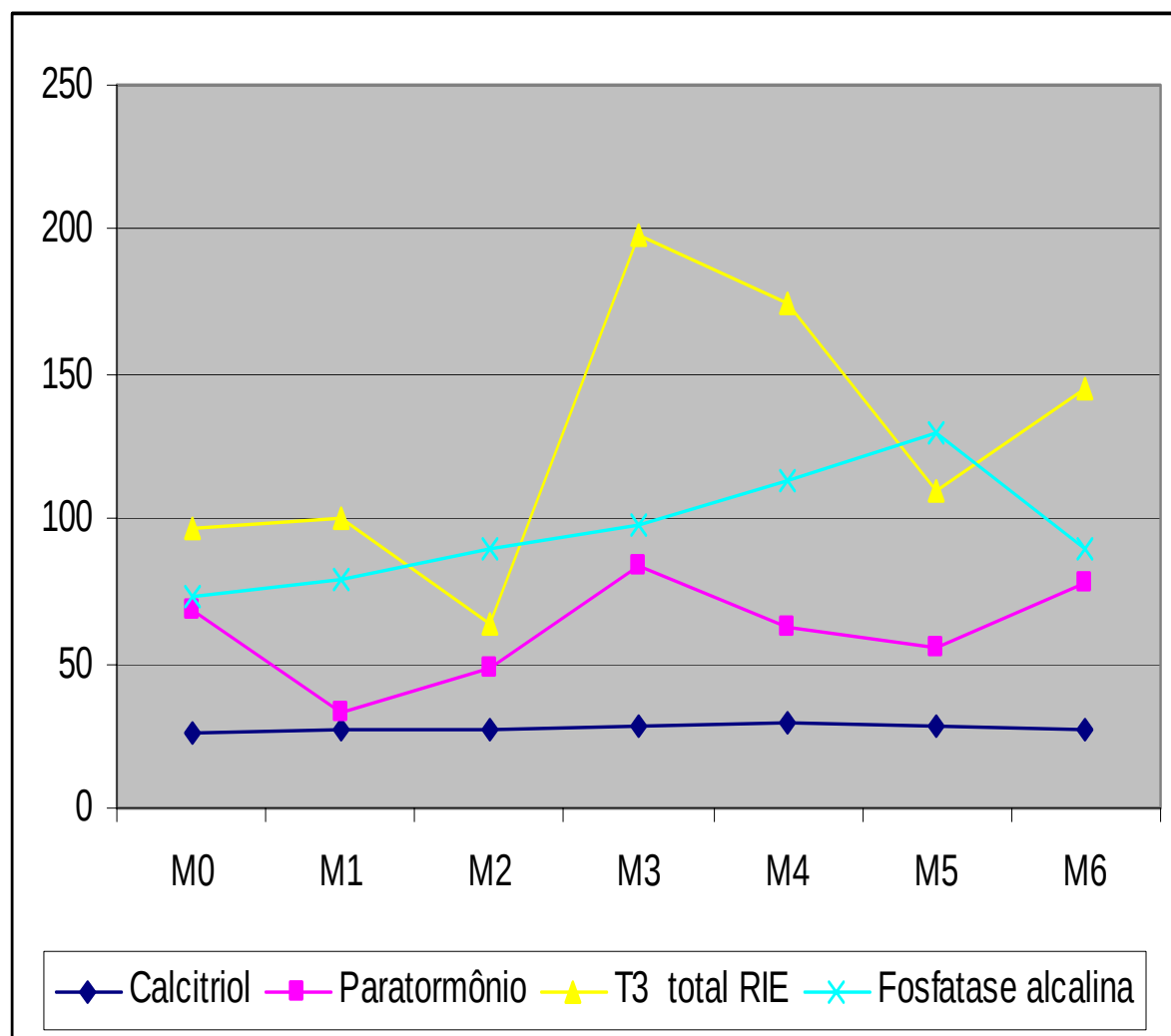


FIGURA 21: curvas de valores médios de calcitriol, paratormônio, T3 total livre e fosfatase alcalina durante os momentos, Botucatu-2004

M0-Pico de LH+8dias, M1-28 dias pós-LH, M2-48 dias pós-LH, M3-parto, M4-15 dias pós-parto, M5-45 dias pós-parto, M6-75 dias pós-parto

Controle citológico

O controle citológico se mostrou eficiente para a determinação do estro e início do diestro, visto que todas as cadelas acompanhadas e cobertas apresentaram prenhez positiva e tempo de gestação compatível com a literatura.

Correlações entre variáveis encontradas

Não houve correlação entre o número de filhotes e as variáveis estudadas.

MO

Fósforo X T3 quimio r: 0,79 p: 0,0061

Fósforo X calcitonina r: 0,99 p: 0,0001

Proteína total X T3 radioimunoensaio r: 0,81 p: 0,005

M1

Cálcio X T4 canino r: 0,68 p: 0,03

Fósforo X T4 canino r: 0,64 p: 0,04

Fosfatase alcalina X osteocalcina r: 0,71 p: 0,02

Cálcio X T4 livre radioimunoensaio r: 0,78 p: 0,007

Fosfatase alcalina X T4 radioimunoensaio r: 0,66 p: 0,04

M2

Albumina X estradiol r: 0,68 p: 0,03

Albumina X T4 livre radioimunoensaio r: 0,75 p: 0,01

Cálcio X T4 livre radioimunoensaio r: 0,75 p: 0,01

Cálcio X T3 radioimunoensaio r: 0,66 p: 0,04

M3

Albumina X calcitriol r: 0,84 p: 0,002

Albumina X calcitonina r: 0,91 p: 0,0001

Fosfatase alcalina X progesterona r: 0,69 p: 0,03

Cálcio X estradiol r: 0,78 p: 0,008

Albumina X T4 radioimunoensaio r: 0,81 p: 0,004

Proteína total X T4 radioimunoensaio r: 0,82 p: 0,04

M4

Proteína total X T4 quimio r: 0,78 p: 0,007

Fosfatase alcalina X paratormônio r: 0,74 p: 0,01

M5

Não houve correlações entre as variáveis

M6

Cálcio X progesterona r: 0,65 p: 0,04

Fósforo X progesterona r: 0,66 p: 0,04

Proteína total X estradiol r: 0,65 p: 0,04

Albumina X T4 livre radioimunoensaio r: 0,73 p: 0,02

Fosfatase alcalina X T4 livre radioimunoensaio r: 0,84 p: 0,002

Discussão

Estavam previstas colheitas de amostras de 15 cadelas gestantes, porém cinco fêmeas foram descartadas por apresentarem alguma alteração metabólica (indução de parto, uso de qualquer medicamento e cesariana), sendo, então, realizadas as dosagens e avaliação estatística dos resultados de 10 cadelas, que demonstrou significância estatística das amostras.

Apesar do que diz a literatura sobre a gestação e lactação poder provocar uma deficiência mineral na fêmea (Malluche et al, 1982; Gruber, Gutterridge & Baylink, 1984; Brommage & Deluca, 1985; Colussi *et al.*, 1987; Fukuda & Iida, 1993) isto não foi observado em nenhum momento do experimento com suplementação alimentar, tendo sido observada uma tendência à diminuição das concentrações de cálcio e fósforo do M0 até o M2 e posterior aumento destas concentrações, coincidente com o incremento mineral alimentar apenas com a mudança da ração.

Segundo CAPEN & MARTIN (1977), CHEW & DIBARTOLA (1992) e YAPHÉ & FORRESTER (1994) o calcitriol, a calcitonina e o paratormônio são responsáveis pelo metabolismo de cálcio e fósforo, o

que foi observado neste experimento foi uma estabilidade nestes três hormônios, pois como já dito anteriormente os valores de cálcio e fósforo se mantiveram na normalidade.

Segundo SLATOPOLSKY, MARTIN & HRUSKA (1980) existem três mecanismos de retirada de cálcio dos ossos para manutenção dos níveis séricos. No caso das cadelas deste experimento, o que pode ter colaborado com esta manutenção foi que, a partir dos 40 dias de gestação, houve a mudança de ração, o que representou um incremento de 23,1% na concentração e conseqüente ingestão de cálcio.

Ao se confrontar os momentos de colheita observamos que somente o PTH e o calcitriol variaram significativamente ($p < 0,05$) entre M0 e M1, não havendo outras variações. O fato de que a calcitonina, o calcitriol e o paratormônio, que trabalham em conjunto, não terem sido afetados pela gestação ou lactação, pode ser um indicador da eficiência da correção alimentar ou de que não há a real necessidade de se intervir na homeostase mineral durante a gestação e lactação, como ocorre atualmente na rotina de parte dos médicos veterinários.

Os valores de osteocalcina não apresentaram variações estatisticamente significativas em nenhum momento do experimento, enquanto a fosfatase alcalina apresentou variação entre todos os momentos, o que mostrou uma tendência da osteocalcina em acompanhar os hormônios da homeostase mineral, que também não variaram. Estes resultados são concordantes com a literatura que cita a osteocalcina como um melhor marcador de *turnover* ósseo que a fosfatase alcalina (Power & Fottrell, 1991; Allen & Richardson, 1998) por ser uma proteína óssea específica (Power & Fottrell, 1991; Arican, Carter & Bennett, 1996; Allen & Richardson, 1998), sendo uma opção a esta.

Como relatam POWER & FOTTRELL (1991) e ALLEN & RICHARDSON (1998) a síntese de osteocalcina é dependente do calcitriol, o que pode ser comprovado pela ausência de alterações em ambas as variáveis.

Conforme exposto na literatura, os hormônios da tireóide estão relacionados com alterações na absorção de cálcio e fósforo (Rosol & Capen, 1996; Davidson, 2000). Neste trabalho não foi testada a absorção destes minerais, porém foram observados alguns episódios de

correlação entre estes hormônios e cálcio e/ou fósforo, o que pode também ser concordante com a sua absorção.

Foram observadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os momentos dos hormônios da tireóide em todos os métodos utilizados, o que pode representar um aumento na necessidade energética nas fases da gestação e lactação, porém em nenhum momento houve concentrações acima ou abaixo da escala de normalidade.

A diferença entre T3 total e T4 total pode ser explicado pelo comportamento hormonal de algumas cadelas, que elevou a média de T3 total (cadela 3, 5, 6 e 9 elevaram a média no M3 e as cadelas 1, 4, 5, 8 e 10 elevaram a média no M4).

REIMERS *et al.* (1984) atestaram que o T4 está aumentado nas cadelas em diestro ou gestantes e sugeriu como causa o aumento de progesterona nestas fases. O que foi observado no presente estudo foi um real aumento nas concentrações de T4 total durante a gestação, porém a correlação com a progesterona não foi comprovada, o que de certa forma é satisfatório, pois representa que não há um *feedback* da progesterona na concentração normal de T4, o que representaria uma

mudança nos conceitos de castração de cadelas, pois caso houvesse, as cadelas castradas teriam propensão ao hipotireoidismo.

REIMERS *et al.* (1981), bem como ECKERSALL & WILLIAMS (1983) relatam problemas na utilização de *kits* de radioimunoensaio humanos para o T4 por apresentarem limites de detecção baixos, o que representa falha em 17% dos animais testados. Este problema não foi observado neste experimento, o que é concordante com YOUNG, SARTIN & KEMPPAINEN (1985), LEE, LAMB & REIMERS (1991), NELSON *et al.* (1991), REIMERS *et al.* (1991), TORRES, MCKEEVER & JOHNSTON (1991) e PANCIERA & POST (1992). Porém este método pode ser substituído pelo *kit* de quimioluminescência específico para cães, que foi testado e apresentou boa sensibilidade e demonstrando semelhança com o aumento de T4 em presença de progesterona que REIMERS *et al.* (1984) relatam.

Existem duas vertentes quanto às concentrações de estradiol, uma que relata concentrações estáveis durante a gestação (Hadley, 1975; Austad, Lunde & Sjaastad, 1976; Vannucchi, 2000) e a segunda que refere aumentos significativos durante a gestação, com pico anterior ao parto (Feldman & Nelson, 1987a; Concannon *et al.*, 1989).

Os resultados deste experimento são semelhantes ao da primeira hipótese, pois foi observada uma queda nas concentrações de estradiol, com significância estatística ($p < 0,05$), durante a gestação, principalmente entre o M0 e M1 e posterior manutenção em concentrações baixas.

O *kit* de radioimunoensaio utilizado neste experimento para dosagem de estradiol apresentou uma pequena falha de sensibilidade, havendo a necessidade de correção da curva de calibração através de programa computacional, devendo-se optar por outro *kit*.

As características de mudança comportamental e citológicas vaginais provocadas pelo estrógeno no estro e transição para diestro propostas por FELDMAN & NELSON (1996a) foram observadas neste experimento e foram de fundamental importância para a determinação desta transição.

Os resultados do presente trabalho experimental demonstram concordância com literatura (Hadley, 1975; Gräf, 1978; Purswell & Parker, 2000; Vannucchi, 2000), que relata que a progesterona tem sua concentração crescente durante o estro, mantendo níveis séricos altos durante a gestação e diminuindo antes do parto, o que pode significar

que este hormônio realmente é o mantenedor da gestação, como proposto por HADLEY, 1975; GRÄF, 1978; PURSWELL & PARKER, 2000; VANNUCCHI, 2000; ROOT KUSTRITZ, 2001; DAVIDSON & FELDMAN, 2004 e SCHAEFERS-OKKENS, 2004. Estes resultados são melhor observados na curva de progesterona, em que se pode notar uma queda nas concentrações entre o M2 e M3.

A correlação entre os hormônios progesterona e estrógeno e o fósforo proposta por FELDMAN & NELSON (1987c), ORTOLANI (1999) e PAULINO & BONDAN (1999) não foi observada neste experimento, o que pode explicar o fato do PTH ter se mantido estável, visto que este mineral é fundamental para o incremento deste hormônio, como foi comprovado por MACHADO (2000). O incremento de 64,3% na ingestão de fósforo promovido pela troca alimentar pode ter contribuído para esta manutenção hormonal, tendo em vista que a manutenção nas concentrações de fósforo mantém a normalidade do PTH, evitando a ação osteoclástica e osteocítica deste hormônio, descritas por CAPEN & MARTIN, 1977; HIGH, CAPEN & BLACK, 1981; BANKS, 1992; CHEW & DIBARTOLA, 1992; YAPHÉ & FORRESTER, 1994; ROSOL & CAPEN, 1996; PAULINO & BONDAN, 1999.

No que diz respeito às proteínas plasmáticas e albumina, o que se observou foi uma tendência a diminuição de suas concentrações do M0 ao M2, como já havia sido observado quanto ao cálcio e fósforo, sendo normalizado após o aumento da ingesta de proteína em 38,5%.

A pesquisa de outros métodos como alternativa ao radioimunoensaio tendo como justificativa fatores de segurança (Jericó *et al.*, 1999; Lazaretti *et al.*, 1999) e o tempo de incubação (Garner & Leigh, 1999), o que nos leva a pesquisar métodos como a quimioluminescência, porém este estudo experimental demonstrou que alguns *kits* desenvolvidos para humanos não apresentam boa sensibilidade e especificidade, pois foram encontrados muitos valores abaixo do limite de detecção (80% T3 total, 100% T3 livre e 28% T4 total), como já havia sido comprovado por MACHADO (2000) para o paratormônio intacto em caninos saudáveis. O mesmo não foi observado para o T4 livre e T4 canino, o que demonstra que pode não ser o método a causa da falha, mas o *kit* utilizado.

A monitorização das alterações em células queratinizadas pela citologia vaginal se mostrou um método eficiente para o controle do momento de cobertura, apesar da literatura referir a associação com

dosagens de progesterona seqüenciais (Wildt, *et al.*, 1979; Hay *et al.*, 2000; Root Kustritz, 2001; Betini, Moraes e Rigolon, 2001) o presente trabalho tentou, conseguindo resultados satisfatórios, utilizar o método menos oneroso e prático para o clínico particular.

Foi seguido o que FELDMAN & NELSON (1996a), GOODMAN (2001), NEVES *et al.* (2001), ROOT KUSTRITZ (2001) e DAVIDSON & FELDMAN (2004) relataram, que em geral há presença de hemácias no esfregaço de citologia vaginal durante o estro, além de 80 a 100% de células superficiais e ausência de neutrófilos, havendo então uma alteração abrupta no início do diestro citológico, com o reaparecimento das células epiteliais parabasais e, freqüentemente neutrófilos. Conforme constatado nos resultados, este padrão se mostrou eficiente, visto que 100% das cadelas apresentaram prenhez positiva e com parto dentro dos padrões previstos.

A média de gestação observada neste experimento foi de 58 dias pós diestro citológico, entrando em concordância com JOHNSTON, ROOT KUSTRITZ E OLSON (2001), que refere com média de 56,9 dias. Este resultado é bastante útil para que possamos prever o tempo de gestação e possíveis intervenções caso haja

distocia, podendo associar este dado com o acompanhamento fetal por método ultrasonográfico para determinar se há a necessidade de intervenção cirúrgica ou medicamentosa para a indução de parto, sem o risco de se obter produtos prematuros.

Conclusões

Nas condições em que foi realizado este experimento foi possível concluir que:

- os valores de cálcio, paratormônio, calcitriol e calcitonina demonstraram não haver tendência a hipocalcemia e correção hormonal;
- os hormônios tireoidianos e os momentos M4 e M5 (lactação) foram os que apresentaram mais correlações;
- a osteocalcina é mais específica como marcadora óssea que a fosfatase alcalina;
- os valores de cálcio, fósforo, proteína total e albumina foram corrigidos com o incremento destes na ingesta;
- os valores de estradiol se mantiveram estáveis durante toda a gestação e a progesterona aumentou no início do diestro e diminuindo ao final da gestação e lactação;
- os hormônios que mais de correlacionaram com outras variáveis foram os tireoidianos, que pode ser justificada pelas suas funções metabólicas;

- os momentos correspondentes a lactação (M4 e M5) foram os que apresentaram menor índice de correlação entre as variáveis;
- o método de quimioluminescência para dosagem de T3 total e livre e T4 total não apresentaram sensibilidade;
- o método de quimioluminescência de T4 total específico para caninos mostrou boa sensibilidade e especificidade;
- foi possível estabelecer curvas de acontecimento para todas as variáveis, exceto aquelas que apresentaram um ou mais valores abaixo do limite de detecção do método utilizado;
- os métodos de radioimunoensaio utilizados para mensuração de osteocalcina, calcitonina e calcitriol mostraram ter boa sensibilidade e eficiência;
- não houve correlação entre o número de filhotes e as demais variáveis estudadas.

Anexos

Tabela 22 - resultados da cadela 1 durante o experimento

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Média	Desvio Padrão	Nº de filhotes
T4 RIA ($\mu\text{g/dL}$)	2,9	3,5	4,8	1,6	4,2	1,2	0,8	2,7	1,5	7
T3 RIA (ng/mL)	90,2	120,3	29,4	65,7	288,5	101,2	81,1	110,9	83,3	
T4 livre RIA (ng/mL)	0,3	0,4	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	
Estradiol RIA (pg/dL)	3,3	4,1	1,6	1,9	1,1	1,2	1,2	2,1	1,2	
Progesterona RIA (ng/mL)	10	11,6	15,7	16,4	2	3,2	5,4	7,9	0,6	
PTH RIA (pg/dL)	66,8	21,2	85,8	58	28,8	44,2	73,1	53,9	23,6	
Osteocalcina RIA (ng/mL)	1,4	<0,1	<0,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	0,1	
Calcitonina RIA (pg/dL)	11	11	12	13	18	20	22	15,2	4,6	
Calcitriol RIA (pg/dL)	28	32	33	25	26	28	30	28,8	2,9	
T4 Químio ($\mu\text{g/dL}$)	1,3	1,1	1	1,1	<1	<1	<1	1,1	0,1	
T3 Químio (ng/mL)	<40	47,8	<40	<40	<40	<40	<40			
T3 livre Químio (pg/dL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1			
T4 livre Químio (ng/mL)	1,4	1,4	0,8	0,8	0,9	0,7	0,9	0,9	0,2	
T4 canino Químio ($\mu\text{g/dL}$)	1,2	1,2	1	1	0,5	0,8	0,6	0,9	0,2	
Cálcio (mg/dL)	11	9,5	9	10,2	10	9,5	11,1	10,0	0,7	
Fósforo (mg/dL)	3,1	2,9	2,8	3,2	3,5	3,6	4	3,3	0,4	
Proteína total (mg/dL)	6,5	6	5,5	5,4	6	6,2	7	6,0	0,5	
Albumina (mg/dL)	3,1	3,1	2,9	2,8	3,1	3	3	3,0	0,1	
Fosfatase alcalina (mg/dL)	56	75	90	91	110	122	61	86,4	24,3	

Tabela 23 - resultados da cadela 2 durante o experimento

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Média	Desvio Padrão	Nº de filhotes
T4 RIA ($\mu\text{g/dL}$)	2,6	3,2	1,3	2,5	2,1	1,9	1,9	2,2	0,6	5
T3 RIA (ng/mL)	103,0	151,9	39,3	66,8	75,0	54,3	34,4	74,9	41,0	
T4 livre RIA (ng/mL)	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	
Estradiol RIA (pg/dL)	2,0	4,6	1,4	0,9	1,8	1,7	0,9	1,9	1,2	
Progesterona RIA (ng/mL)	1	10,4	15,2	16,4	2,9	3,6	7,6	8,2	0,6	
PTH RIA (pg/dL)	57,2	20,7	28,9	89,1	33	32,6	34,9	42,3	23,4	
Osteocalcina RIA (ng/mL)	1,4	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	0,1	
Calcitonina RIA (pg/dL)	11	11	12	14	18	20	16	14,5	3,5	
Calcitriol RIA (pg/dL)	20	25	25	25	32	25	25	25,2	3,5	
T4 Químio ($\mu\text{g/dL}$)	1,6	1,2	<1	1,1	<1	<1	1,2	1,2	0,2	
T3 Químio (ng/mL)	44,5	53,7	<40	<40	<40	<40	<40			
T3 livre Químio (pg/dL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1			
T4 livre Químio (ng/mL)	1,3	1,4	0,7	0,8	1	0,9	0,9	1,00	0,2	
T4 canino Químio ($\mu\text{g/dL}$)	1,3	1,2	1,1	1	0,7	0,8	1	1,0	0,2	
Cálcio (mg/dL)	10,3	9,2	8,6	9,1	9,9	9,5	11,1	9,6	0,8	
Fósforo (mg/dL)	3,1	2,7	2,9	3,2	3,2	3,3	4	3,2	0,4	
Proteína total (mg/dL)	6,5	5,8	5,3	5,4	5,9	6,1	7	6,0	0,6	
Albumina (mg/dL)	3,1	3,1	2,9	2,8	3,1	3	2,9	2,9	0,1	
Fosfatase alcalina (mg/dL)	62	80	89	91	120	132	61	90,7	27,0	

Tabela 24 - resultados da cadela 3 durante o experimento

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Média	Desvio Padrão	Nº de filhotes
T4 RIA ($\mu\text{g/dL}$)	2,8	4,5	1,6	0,9	2,7	1,8	1,9	2,3	1,1	10
T3 RIA (ng/mL)	91,3	41,5	90,4	220,4	33,8	74,2	449,3	143,0	148,4	
T4 livre RIA (ng/mL)	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	
Estradiol RIA (pg/dL)	4,8	1,0	0,4	1,1	0,4	0,5	0,7	1,3	1,5	
Progesterona RIA (ng/mL)	1	8,4	15,1	4,7	1,5	2,3	4,6	5,4	0,5	
PTH RIA (pg/dL)	39,9	33,4	68,5	239	45,5	54,2	114,9	85,0	73,1	
Osteocalcina RIA (ng/mL)	1,1	1,1	1,1	1,1	<0,1	<0,1	<0,1	1,1	0,0	
Calcitonina RIA (pg/dL)	11	12	12	11	15	14	11	12,2	1,6	
Calcitriol RIA (pg/dL)	25	26	23	24	30	30	25	26,14	2,7	
T4 Químio ($\mu\text{g/dL}$)	1	1,3	1,3	<1	1,1	<1	1,2	1,1	0,1	
T3 Químio (ng/mL)	<40	49,1	<40	<40	<40	<40	<40			
T3 livre Químio (pg/dL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1			
T4 livre Químio (ng/mL)	1,2	1,5	0,8	0,7	0,8	0,8	0,9	0,9	0,2	
T4 canino Químio ($\mu\text{g/dL}$)	1,2	1,1	1,1	0,6	1,1	1	1	1,0	0,2	
Cálcio (mg/dL)	10,8	9,5	8,9	10	9,9	9,2	11	9,9	0,7	
Fósforo (mg/dL)	3	2,7	2,7	3	3,3	3,6	3,6	3,1	0,3	
Proteína total (mg/dL)	6,2	5,9	5,3	5,4	6,2	6	6,9	5,9	0,5	
Albumina (mg/dL)	3,2	3	2,7	2,8	2,9	3,2	3	2,9	0,1	
Fosfatase alcalina (mg/dL)	65	81	99	97	120	150	70	97,4	29,8	

Tabela 25 - resultados da cadela 4 durante o experimento

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Média	Desvio Padrão	Nº de filhotes
T4 RIA ($\mu\text{g/dL}$)	0,5	2,8	3,6	3,9	2,7	2,3	1,8	2,5	1,1	4
T3 RIA (ng/mL)	97,1	128,5	24,4	62,2	485,1	95,6	89,2	140,3	155,4	
T4 livre RIA (ng/mL)	0,4	0,3	0,2	0,2	0,17	0,1	0,1	0,2	0,1	
Estradiol RIA (pg/dL)	4,5	3,28	0,7	0,9	0,3	0,4	0,6	1,5	1,6	
Progesterona RIA (ng/mL)	1	9	17,2	15,3	2,6	3	3,5	7,4	0,6	
PTH RIA (pg/dL)	161,1	68,8	33,4	49,9	21,6	44,2	122,3	71,6	51,2	
Osteocalcina RIA (ng/mL)	1,1	1,1	<0,1	1,1	1	1,1	1,1	1,0	0,0	
Calcitonina RIA (pg/dL)	11	11	12	16	14	15	11	12,8	2,1	
Calcitriol RIA (pg/dL)	25	25	30	30	30	26	26	27,4	2,4	
T4 Químio ($\mu\text{g/dL}$)	1,1	1,3	1,2	1	<1	<1	1,2	1,1	0,1	
T3 Químio (ng/mL)	<40	55,6	<40	<40	<40	<40	<40			
T3 livre Químio (pg/dL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1			
T4 livre Químio (ng/mL)	1,2	1,3	0,9	0,9	1	0,8	0,8	0,9	0,2	
T4 canino Químio ($\mu\text{g/dL}$)	1,4	1,1	1	1	0,5	0,6	1	0,9	0,3	
Cálcio (mg/dL)	10	9,3	8,7	9,6	9,4	9,5	10,7	9,6	0,6	
Fósforo (mg/dL)	3	2,7	2,8	3,1	3,3	3,4	3,9	3,1	0,4	
Proteína total (mg/dL)	6,2	5,9	5,3	5,5	6,1	6,3	6,9	6,0	0,5	
Albumina (mg/dL)	3	2,9	2,8	3,1	3,2	3,2	3,3	3,0	0,1	
Fosfatase alcalina (mg/dL)	60	78	84	99	105	130	120	96,5	24,4	

Tabela 26 - resultados da cadela 5 durante o experimento

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Média	Desvio Padrão	Nº de filhotes
T4 RIA ($\mu\text{g/dL}$)	1,4	2,8	4,9	3,3	1,2	0,7	0,6	2,1	1,5	5
T3 RIA (ng/mL)	75,6	67,1	66,9	314,7	233,4	255,3	363,4	196,6	125,7	
T4 livre RIA (ng/mL)	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	
Estradiol RIA (pg/dL)	4,6	1,5	1,0	1,5	0,5	0,3	0,2	1,4	1,5	
Progesterona RIA (ng/mL)	1	8,8	14,3	14,7	2,2	2,6	2,6	6,5	0,6	
PTH RIA (pg/dL)	102,6	37,6	41,7	62,8	20,3	54,2	92,7	58,8	29,8	
Osteocalcina RIA (ng/mL)	1,1	1,1	1,1	<0,1	<0,1	1,1	1,1	1,1	0,0	
Calcitonina RIA (pg/dL)	11	11	20	20	20	11	11	14,8	4,8	
Calcitriol RIA (pg/dL)	25	26	25	30	30	30	25	27,2	2,5	
T4 Químico ($\mu\text{g/dL}$)	1,1	1,2	<1	1	1,1	<1	1	1,0	0,0	
T3 Químico (ng/mL)	<40	50,7	<40	<40	<40	<40	<40			
T3 livre Químico (pg/dL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1			
T4 livre Químico (ng/mL)	1,2	1,5	0,8	0,9	1	1	0,9	1,0	0,2	
T4 canino Químico ($\mu\text{g/dL}$)	1,2	1,1	1,2	1,1	1,2	1	1,1	1,1	0,0	
Cálcio (mg/dL)	10	9	8,5	10,3	10,1	10,3	11	9,8	0,8	
Fósforo (mg/dL)	3	2,8	2,7	3	3,2	3,4	3,9	3,1	0,4	
Proteína total (mg/dL)	6	6	5,3	6,2	6,3	6,2	6,9	6,1	0,4	
Albumina (mg/dL)	3	3	2,9	3,3	3,2	3,1	3,5	3,1	0,2	
Fosfatase alcalina (mg/dL)	60	81	91	101	122	135	150	105,7	31,6	

Tabela 27 - resultados da cadela 6 durante o experimento

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Média	Desvio Padrão	Nº de filhotes
T4 RIA ($\mu\text{g/dL}$)	2,8	1,6	1,5	3,5	0,1	0,3	1,4	1,6	1,2	6
T3 RIA (ng/mL)	94,0	70,3	88,0	541,1	84,1	95,3	212,9	169,4	170,7	
T4 livre RIA (ng/mL)	0,3	0,4	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	
Estradiol RIA (pg/dL)	3,3	1,6	1,4	1,3	0,9	1,0	0,1	1,4	0,9	
Progesterona RIA (ng/mL)	1	9,1	19,8	16,4	9,1	7,4	6	9,8	0,6	
PTH RIA (pg/dL)	49,2	30,1	37,9	22,3	86,1	102,6	208,4	76,6	65,1	
Osteocalcina RIA (ng/mL)	1,1	1,1	1,1	1,4	<0,1	1,1	1,1	1,1	0,1	
Calcitonina RIA (pg/dL)	11	11	11	15	11	11	11	11,5	1,5	
Calcitriol RIA (pg/dL)	25	29	30	30	30	25	25	27,7	2,5	
T4 Químio ($\mu\text{g/dL}$)	1,1	1,4	1,1	<1	1	<1	1	1,12	0,1	
T3 Químio (ng/mL)	<40	46,6	50,5	<40	<40	<40	<40			
T3 livre Químio (pg/dL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1			
T4 livre Químio (ng/mL)	1,4	1,4	0,8	0,7	1	1	0,8	1,01	0,2	
T4 canino Químio ($\mu\text{g/dL}$)	1,3	1,2	1,1	1	1,1	1	1,2	1,13	0,1	
Cálcio (mg/dL)	10	9	8,5	10	10,1	9,8	10	9,6	0,6	
Fósforo (mg/dL)	3	2,9	2,7	3	3,2	3,1	3,5	3,0	0,2	
Proteína total (mg/dL)	6,2	6,1	6	6,5	6,3	6,2	6,5	6,2	0,1	
Albumina (mg/dL)	3	2,9	2,9	3,1	3,1	3	3,1	3,0	0,1	
Fosfatase alcalina (mg/dL)	66	74	89	93	105	132	77	90,8	22,3	

Tabela 28 - resultados da cadela 7 durante o experimento

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Média	Desvio Padrão	Nº de filhotes
T4 RIA ($\mu\text{g/dL}$)	1,3	2,4	2,4	3,3	1,1	1,0	1,0	1,8	0,9	7
T3 RIA (ng/mL)	101,3	116,2	42,9	57,5	73,0	75,0	74,0	77,1	24,8	
T4 livre RIA (ng/mL)	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	
Estradiol RIA (pg/dL)	4,3	1,6	4,2	1,4	<0,1	0,3	0,2	2,0	1,8	
Progesterona RIA (ng/mL)	1	9,1	15,2	15,8	7	6,8	1,3	8	0,5	
PTH RIA (pg/dL)	106,1	30,1	66,3	72,7	15	31,2	44,5	52,2	31,3	
Osteocalcina RIA (ng/mL)	1,1	<0,1	1	1,1	1,1	1,1	<0,1	1,0	0,1	
Calcitonina RIA (pg/dL)	11	15	15	15	15	15	15	14,4	1,5	
Calcitriol RIA (pg/dL)	25	25	26	30	30	25	25	26,5	2,3	
T4 Químio ($\mu\text{g/dL}$)	1	1,3	1,1	1,5	1,2	1	1,2	1,1	0,1	
T3 Químio (ng/mL)	<40	50,3	<40	<40	<40	<40	<40			
T3 livre Químio (pg/dL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1			
T4 livre Químio (ng/mL)	1,5	1,4	0,8	0,7	0,9	0,8	1	1,0	0,3	
T4 canino Químio ($\mu\text{g/dL}$)	1,3	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	0,1	
Cálcio (mg/dL)	11,2	9,2	9,1	10,3	10,1	10,2	11	10,1	0,8	
Fósforo (mg/dL)	3,3	3,2	3,1	3,2	3,4	3,5	3,9	3,3	0,2	
Proteína total (mg/dL)	7	6,3	6	6,3	6,5	6,1	6,7	6,4	0,3	
Albumina (mg/dL)	3,5	3,4	3	3,2	3,3	3,3	3,3	3,2	0,1	
Fosfatase alcalina (mg/dL)	77	65	86	95	128	139	88	96,8	26,9	

Tabela 29 - resultados da cadela 8 durante o experimento

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Média	Desvio Padrão	Nº de filhotes
T4 RIA ($\mu\text{g/dL}$)	3,6	5,7	1,6	5,2	0,3	0,4	0,4	2,5	2,3	9
T3 RIA (ng/mL)	110,0	79,1	139,6	79,2	202,1	96,2	52,0	108,3	49,6	
T4 livre RIA (ng/mL)	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	
Estradiol RIA (pg/dL)	6,5	1,3	1,1	1,18	<0,1	<0,1	1	2,2	2,4	
Progesterona RIA (ng/mL)	1	8,4	15,2	2,6	6,5	7,5	5,9	6,7	0,4	
PTH RIA (pg/dL)	16,8	46,7	30,5	83,9	203,7	75,6	53	72,8	62,2	
Osteocalcina RIA (ng/mL)	1,1	1,2	1,1	1,1	1,1	<1	<0,1	1,1	0,1	
Calcitonina RIA (pg/dL)	11	12	12	20	20	12	12	14,1	4,0	
Calcitriol RIA (pg/dL)	25	30	30	33	32	30	30	30,0	2,5	
T4 Químio ($\mu\text{g/dL}$)	1,4	1,4	1,1	1	1,2	1	1,1	1,1	0,1	
T3 Químio (ng/mL)	42	48,4	<40	<40	<40	<40	<40			
T3 livre Químio (pg/dL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1			
T4 livre Químio (ng/mL)	1,4	1,4	0,9	0,7	0,8	0,9	0,8	0,9	0,2	
T4 canino Químio ($\mu\text{g/dL}$)	1,5	1,2	1	0,8	1	1	1,1	1,0	0,2	
Cálcio (mg/dL)	9	8,5	8	10	9,9	9,2	10,5	9,3	0,8	
Fósforo (mg/dL)	3	3,2	3,1	3	3	3,2	3,3	3,1	0,1	
Proteína total (mg/dL)	7,2	7	6,5	7,3	7	6,5	7,2	6,9	0,3	
Albumina (mg/dL)	3,4	3,2	3	3,4	3,5	3,1	3,2	3,2	0,1	
Fosfatase alcalina (mg/dL)	88	92	75	99	96	88	78	88,00	8,8	

Tabela30 - resultados da cadela 9 durante o experimento

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Média	Desvio Padrão	Nº de filhotes
T4 RIA ($\mu\text{g/dL}$)	2,7	3,0	5,0	2,7	1,4	0,9	0,6	2,3	1,5	11
T3 RIA (ng/mL)	100,6	93,7	50,9	507,4	51,2	52,6	61,9	131,2	167,2	
T4 livre RIA (ng/mL)	0,3	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	
Estradiol RIA (pg/dL)	4,3	1,2	0,9	1,3	0,7	<0,1	<0,1	1,7	1,5	
Progesterona RIA (ng/mL)	1	8,1	1,5	3,5	7,8	8,2	17	8,7	0,5	
PTH RIA (pg/dL)	56,8	27,4	23,1	115,5	122,7	75,6	15	62,3	44,1	
Osteocalcina RIA (ng/mL)	1,1	<0,1	1,1	1,1	1,1	1	1,6	1,1	0,2	
Calcitonina RIA (pg/dL)	11	11	12	12	12	12	11	11,5	0,5	
Calcitriol RIA (pg/dL)	25	25	25	25	25	30	25	25,7	1,8	
T4 Químio ($\mu\text{g/dL}$)	1,3	1,1	1	<1	1,1	<1	<1	1,1	0,1	
T3 Químio (ng/mL)	41,9	50,8	<40	<40	<40	<40	<40			
T3 livre Químio (pg/dL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1			
T4 livre Químio (ng/mL)	1,2	1,3	0,8	0,7	0,8	0,8	0,8	0,9	0,2	
T4 canino Químio ($\mu\text{g/dL}$)	1,2	1,2	1,1	0,8	1	1,1	1	1,0	0,1	
Cálcio (mg/dL)	9	8,9	8,9	10,2	9,9	9,4	9,6	9,4	0,5	
Fósforo (mg/dL)	3	2,7	2,8	3,1	3,1	3,1	3,1	2,9	0,1	
Proteína total (mg/dL)	7	6,5	6,2	6,1	6,1	6,1	6,3	6,3	0,3	
Albumina (mg/dL)	3	3	2,8	2,7	3	3	3	2,9	0,1	
Fosfatase alcalina (mg/dL)	110	74	99	101	108	132	98	103,1	17,3	

Tabela31 - resultados da cadela 10 durante o experimento

	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Média	Desvio Padrão	Nº de filhotes
T4 RIA ($\mu\text{g/dL}$)	3,2	2,5	2,6	1,4	1,8	1,6	1,7	2,1	0,6	6
T3 RIA (ng/mL)	107,5	132,1	64,4	67,9	219,3	200,2	32,9	117,7	70,6	
T4 livre RIA (ng/mL)	0,4	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	
Estradiol RIA (pg/dL)	4,9	1,7	0,6	0,8	0,9	0,7	0,2	1,4	1,6	
Progesterona RIA (ng/mL)	1	9,9	14,6	2,3	7,5	6,4	4,2	6,6	0,4	
PTH RIA (pg/dL)	26,1	15	65,4	46,8	50,5	35,6	15	36,3	19,0	
Osteocalcina RIA (ng/mL)	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,3	1,1	0,1	
Calcitonina RIA (pg/dL)	12	10	12	11	11	11	11	11,1	0,6	
Calcitriol RIA (pg/dL)	32	30	25	30	30	30	32	29,8	2,3	
T4 Químico ($\mu\text{g/dL}$)	1,4	1,1	1,1	<1	1,1	<1	<1	1,1	0,1	
T3 Químico (ng/mL)	48,6	49,1	<40	<40	<40	<40	<40			
T3 livre Químico (pg/dL)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1			
T4 livre Químico (ng/mL)	1,2	1,3	0,9	0,7	0,7	0,8	0,9	0,9	0,2	
T4 canino Químico ($\mu\text{g/dL}$)	1,3	1	1,2	0,8	1	1	0,5	0,9	0,2	
Cálcio (mg/dL)	11	10	9,1	9,3	9,2	9,5	10,1	9,7	0,6	
Fósforo (mg/dL)	5	4,5	4,1	5,1	4,9	4,8	4,2	4,6	0,4	
Proteína total (mg/dL)	7	6,5	5,5	5,2	6,5	6,8	7,1	6,3	0,7	
Albumina (mg/dL)	3,5	3,3	2,7	2,8	3,3	3,2	3,6	3,2	0,3	
Fosfatase alcalina (mg/dL)	88	85	95	106	115	135	97	103,0	17,4	

Tabela 32 - média e desvio padrão dos hormônios T4 RIA, T3 RIA, T4 livre RIA, estradiol, progesterona, PTH RIA, osteocalcina RIA e calcitonina RIA.

CADELA	T4 RIA	T3 RIA	T4 LIVRE RIA	ESTRADIOL	PROGESTERONA	PTH RIA	OSTEOCALCINA RIA	CALCITONINA RIA
1	2,7±1,5	110,9±83,3	0,2±0,1	2,1±1,2	7,9±0,6	53,9±23,6	1,1±0,1	15,2±4,6
2	2,2±0,6	74,9±41,0	0,2±0,1	1,9±1,2	8,2±0,6	42,3±23,4	1,1±0,1	14,5±3,5
3	2,3±1,1	143,0±148,4	0,2±0,1	1,3±1,5	5,4±0,5	85,0±73,1	1,1±0,1	12,2±1,6
4	2,5±1,1	140,3±155,4	0,2±0,1	1,5±1,6	7,4±0,6	71,6±51,2	1,0±0,1	12,8±2,1
5	2,1±1,5	196,6±125,7	0,2±0,1	1,4±1,5	6,5±0,6	58,8±29,8	1,1±0,1	14,8±4,8
6	1,6±1,2	169,4±170,7	0,2±0,1	1,4±0,9	9,8±0,6	76,6±65,1	1,1±0,12	11,5±1,5
7	1,8±0,9	77,1±24,8	0,2±0,1	2,0±1,8	8±0,59	52,2±31,3	1,0±0,1	14,4±1,5
8	2,5±2,3	108,3±49,6	0,2±0,1	2,2±2,4	6,7±0,4	72,8±62,2	1,1±0,1	14,1±4,0
9	2,3±1,5	131,2±167,2	0,2±0,1	1,7±1,5	8,7±0,5	62,3±44,1	1,1±0,2	11,5±0,5
10	2,1±0,6	117,7±70,6	0,2±0,1	1,4±1,6	6,6±0,4	36,3±19,0	1,1±0,1	11,1±0,6
Média	2,3±1,3	127±114,5	0,2±0,1	1,6±1,5	7,5±5,5	61,2±45,6	1,1±0,1	13,3±3,1

Tabela 33 - média e desvio padrão dos hormônios calcitriol RIA, T4 quimio, T3 quimio, T3 livre quimio, T4 livre quimio, T4 canino e cálcio.

CADELA	CALCITRIOL RIA	T4 QUIMIO	T3 QUIMIO	T3 LIVRE QUIMIO	T4 LIVRE QUIMIO	T4 CANINO	CÁLCIO
1	28,8±2,9	1,1±0,1	*	*	0,9±0,2	0,9±0,2	10,0±0,7
2	25,2±3,5	1,2±0,2			1,0±0,2	1,0±0,2	9,7±0,8
3	26,1±2,7	1,1±0,1			0,9±0,2	1,0±0,2	9,9±0,7
4	27,4±2,4	1,1±0,1			0,9±0,2	0,9±0,3	9,6±0,6
5	27,2±2,5	1,0±0,1			1,0±0,2	1,1±0,0	9,8±0,8
6	27,7±2,5	1,1±0,1			1,0±0,2	1,1±0,1	9,6±0,6
7	26,5±2,3	1,1±0,1			1,0±0,3	1,1±0,1	10,1±0,8
8	30±2,5	1,1±0,1			0,9±0,2	1,0±0,2	9,3±0,8
9	25,7±1,8	1,1±0,1			0,9±0,2	1,0±0,1	9,4±0,5
10	29,8±2,3	1,1±0,1			0,9±0,2	0,9±0,2	9,7±0,6
Média	27,5±2,9	1,2±0,1			1,0±0,3	1,0±0,2	9,7±0,7

* valores abaixo do limite de detecção do método.

Tabela 34 - média e desvio padrão do fósforo, proteína total, albumina, fosfatase alcalina, número de filhotes e tempo de gestação.

CADELA	FÓSFORO	PROTEÍNA TOTAL	ALBUMINA	FOSFATASE ALCALINA	NÚMERO DE FILHOTES	GESTAÇÃO PÓS DIESTRO CITOLÓGICO (DIAS)
1	3,3±0,4	6,0±0,5	3±0,1	86,4±24,3	7	58
2	3,2±0,4	6±0,6	2,9±0,1	90,7±27,0	5	58
3	3,1±0,3	5,9±0,5	2,9±0,1	97,4±29,8	10	58
4	3,1±0,4	6,0±0,5	3,0±0,1	96,5±24,4	4	59
5	3,1±0,4	6,1±0,4	3,1±0,2	105,7±31,6	5	57
6	3,0±0,2	6,2±0,1	3,0±0,1	90,8±22,3	6	57
7	3,3±0,2	6,4±0,3	3,2±0,1	96,8±26,9	7	59
8	3,1±0,1	6,9±0,3	3,2±0,1	88±8,8	9	58
9	2,9±0,1	9,3±0,3	2,9±0,1	103,1±17,3	11	60
10	4,6±0,4	6,3±0,7	3,2±0,3	103±17,4	6	56
Média	3,3±0,6	6,3±0,5	3,1±0,2	95,9±23,2	7±2,3	58±1,1

Referências Bibliográficas³²

ABOOD, S.K., MAUTERER, J.V., McLOUGHLIN, M.A., BUFFINGTON, C.A.T. Cuidados nutricionais de pacientes hospitalizados. In: **manual de cirurgia de pequenos animais**. 2ªed. São Paulo: Manole. 1998, p.79-100.

AKMAL, M. *et al*. Erythrocyte survival in chronic renal failure. **J. Clin. Invest.**, v. 76, p. 1695-98, 1985.

ALLEN, MJ, RICHARDSON, DC. Serum Markers of bone metabolism in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v.59, p.250-54, 1998.

ARICAN, M, CARTER, SD, BENNETT, D. Osteocalcin in canine joint diseases. **Br. Vet. J.** v.142, p.411-23, 1996.

AUSTAD, R, LUNDE, A, SJAASTAD, V. Peripheral plasma levels of oestradiol 17-beta and progesterone in the bitch during the oestros cycle, in normal pregnancy and after dexamethasone treatment. **J. Reprod. Fertil.** v.46, p.129-36, 1976.

BANKS, W. J. Sistema endócrino. In: _____. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2ªed. São Paulo: Manole, 1992. Cap. 25, p. 521-545.

BELSHAW, BE, RIJNBECK, A. Radioimmunoassay of plasma T4 and T3 in the diagnosis of primary hypothyroidism in dogs. **J. Am. Anim. Hosp. Ass.** v.15, p.17-21, 1979.

³² UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. SãoPaulo: Editora UNESP, 1994.v.2: Referências Bibliográficas. BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia,1996. 468p.

BETINI, C.M., MORAES, G.F., RIGOLON, L.P. Inseminação artificial de cadelas com sêmen fresco diluído em meios formulados com água de coco e leite em pó desnatado. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. V. 25, n.1, p.375-377, 2001.

BOUVY, B., RICHARD, E., DUPRÉ, G. Applications cliniques de l'alimentation entérale assistée chez le chien et le chat: à propos de 85 cas. **Pratique medicale et chirurgicale de l'animal de compagnie**. v.31, n.5, p. 401-408, 1996.

BROMMAGE, R., DELUCA, HF. Regulation of bone mineral loss during lactation. **Endocrinol. Metab.** v.11, p.E182-87, 1985.

BROWN, S. A. *et al.* Pathophysiology and management of progressive renal disease. **The Veterinary Journal**, v. 154, p. 93-109, 1997.

CAPEN, C. C., MARTIN, S. L. Calcium metabolism and disorders of parathyroid glands. **Veterinary Clinics of North America**, v. 7, p. 513-548, 1977.

CHEW, D. J., DIBARTOLA, S. P. Diagnóstico e fisiopatologia da moléstia renal. In: ETTINGER, E. J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 3ªed. São Paulo: Manole, 1992. v. 4, cap. 107, p. 1975-2046.

COLUSSI, G. *et al.* The changes in plasma diffusible levels and renal tubular handling of magnesium during pregnancy: a longitudinal study. **Bone and Mineral**. v.2, p.311-19, 1987.

CONCANNON, P.W., DIGREGORIO, G.B. Canine Vaginal Citology. In: BURKE, T.J. **Small animal Reproduction and Fertility a clinical approach to diagnosis and treatment**. Philadelphia, Lea & Febiger, 1986, cap. 2, p. 96-111.

CONCANNON, PW *et al*. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **J. Reprod. Fertil.** Suplemento39, p.3-25, 1989.

CRANE, S.W. Nutricional support of sich and injured animals. **Veterinary practice**. v.25, n.5, p.8, 1993.

CRISP, M.S., BUFINGTON, C.A.T. Técnicas de cuidados críticos. In: BIRCHARD, S.J., SHERDING, R.G. **Clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, p.32-40, 1998.

CRUESS, RL, HONG, KC. The effect of long term estrogen administration on bone metabolism in the female rat. **Endocrinology**. v.104, p.1188-93, 1979.

DAVIDSON, A. Thyroid dysfunction - diagnosis, treatment, and effect on reproductive performance. EQUINE SYNPOSIUM AND ANNUAL CONFERENCE 2000 SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 2000, San Antonio. **PROCEEDINGS**... San Antonio, 2000, p. 333-38.

DAVIDSON, A.P., FELDMAN, E.C. Alterações ovarianas e do ciclo estral. In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária - doenças do cão e do gato**. 5ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v. 2, cap. 158, p. 1602-1609.

DE-COSTER, R. *et al.* A homologous radioimmunoassay for canine prolactin: plasma levels during the reproductive cycle. **Acta Endoc. Copenhagen.** v.103, p.473-8, 1983.

DELMAS, PD *et al.* Increase in serum bone γ -carboxyglutamic acid protein with aging in women: implications for the mechanism of age-related bone loss. **J. Clin. Invest.** v.71, p.1316-21, 1983.

ECKERSALL, PD, WILLIAMS, ME. Thyroid function tests in dogs using radioimmunoassay kits. **J. Small Anim. Pract.** v.24, p.525-32, 1983.

EXNER, T., KOUTTS, J. Simple immunochromometric assay for protein C activity. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 107, p. 405-411, 1986.

FELDMAN, E. C, NELSON, R.W. Canine female reproduction. In:_____. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction.** Philadelphia: WB Saunders, 1987a, cap. 14, p. 399-480.

FELDMAN, E. C, NELSON, R. W. Hypothyroidism. In:_____. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction.** Philadelphia: WB Saunders, 1987b, cap. 3, p. 55-90.

FELDMAN, E. C, NELSON, R. W. Growth hormone. In:_____. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction.** Philadelphia: WB Saunders, 1987c, cap. 2, p. 29-54.

FELDMAN, E. C, NELSON, R.W. Ovarian cycle and vaginal cytology. In:_____. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction.** Philadelphia: WB Saunders, 1996a, cap. 17, p. 526-46.

FELDMAN, E. C, NELSON, R. W. The parathyroid gland. In:_____. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction.** 2^aed. Philadelphia: WB Saunders, 1996b, cap. 14, p. 454-516.

FUKUDA, S, IIDA, H. Histomorphometric changes in iliac trabecular bone during pregnancy and lactation in beagle dogs. **J. Vet. Med. Sci.** v.55, p.565-69, 1993.

GARNER, S. C., LEIGHT, G. S. Initial experience with intraoperative PTH determinations in the surgical management of 130 consecutive cases of primary hyperparathyroidism. **Surgery**, v. 126, p. 1132-8, 1999.

GARNIER, E. Technique de pose d'une sonde naso-oesophagienne. **Le point vétérinaire**. v.31, n. 204, p.69-71, 2000.

GOODMAN, M. Ovulation Timing. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 31, p. 219-235, 2001.

GRÄF, K.J. Serum oestrogen, progesterone and prolactin concentrations in cyclic, pregnant and lactating beagle dogs. **J. Reprod. Fertil.** v.52, p.9-14, 1978.

GRUBER, HE, GUTTERRIDGE, DH, BAYLINK, DJ. Osteoporosis associated with pregnancy and lactation: bone biopsy and skeletal features in three patients. **Metab. Bone Dis. & Rel. Res.** v.5, p.159-65, 1984.

GUDERMUTH, D.F., CONCANNON, P.W., DAELS, P.F., LASLEY, B.L. Pregnancy-specific elevations in fecal concentrations of estradiol, testosterone and progesterone in the domestic dog (*canis familiaris*). **Theriogenology**. v. 50, p. 237-248, 1998.

GUNDBERG, CM *et al.* Determination of osteocalcin in human serum: results with two kits compared with those by a well-characterized assay. **Clin. Chem.** v.31, p.1720-26, 1989.

GUNDBERG, CM *et al.* Osteocalcin: isolation, characterization and detection. **Methods Enzymol.** v.107, p.516-21, 1984.

HADLEY, JC. Total unconjugated oestrogen and progesterone concentrations in peripheral blood during pregnancy in the dog. **J. Reprod. Fertil.** v.44, p.453-60, 1975.

HAUSCHKA, PV, LIAN, JB, GALLOP, PM. Direct identification of the calcium-binding amino acid g-carboxyglucamate, in mineralized tissue. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.72, p.3926-31, 1975.

HAY, M.A., KING, C.J., GARTLEY, C.J., GOODROWE, K.L. correlation of periovulatory serum and fecal progestins in the domestic dog. **The Canadian Journal of Veterinary Research.** v. 64, p. 59-63, 2000.

HENDY, G. N. *et al.* Characteristics of secondary hyperparathyroidism in vitamin D-deficient dogs. **Am. J. Physiol.**, v. 256, p. E765-E772, 1989.

HIGH, WB, BLACK, HE, CAPEN, CC. Histomorphometric evaluation of the effects of low dose parathyroid hormone administration on cortical bone remodeling in adult dogs. **Labor. Invest.** v.44, p.449-54, 1981.

HIGH, W.B., CAPEN, C.C., BLACK, H.E. The effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol, parathyroid hormone, and thyroxine on trabecular bone remodeling in adult dogs. **Am. J. Pathol.** v.105, p.279-87, 1981.

JERICÓ, M. M. *et al.* Avaliação dos valores séricos de paratormônio intacto, em cães hípidos, utilizando-se o método imunofluorométrico. CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 20, 1999, Águas de Lindóia. **ANAIS...** Águas de Lindóia, 1999, p. 19.

JÖCHLE, W. Prolactin in canine and feline reproduction. **Reproduction Domestic Animals**. v. 32, p. 183-193, 1997.

JOHNSTON, S.D., ROOT KUSTRITZ, M.V., OLSON, P.N.S. **Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia: WB Saunders, 2001, 592 p.

KING, L. G. *et al.* Anemia of chronic renal failure in dogs. **J. Vet. Int. Med.**, v.6, p. 264-270, 1992.

KLAHR, S, SLATOPOLSKY, E. Toxicity of parathyroid hormone in uremia. **Ann. Rev. Med.**, v. 37, p. 71-78, 1986.

LAMB, C. R. The double cortical line: a sign of osteopenia. **J. Small Anim. Pract.**, v. 31, p. 189-192, 1990.

LAZARETTI, P. *et al.* Avaliação da função tireóidea na espécie canina: padronização e comparação entre imunoensaios. CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 20, 1999, Águas de Lindóia. **ANAIS...** Águas de Lindóia, 1999, p. 19.

LEE, D.E., LAMB, S.V., REIMERS, T.J. Effects of hyperlipemia on radioimmunoassays for progesterone, testosterone, thyroxine, and cortisol in serum and plasma samples from dogs. **Am. J. Vet. Res.** v.52, p.1489-91, 1991.

LORENZ, MD, STIFF, ME. Serum thyroxine content before and after thyrotropin stimulation in dogs with suspected hypothyroidism. **J. Am. Vet. Med. Ass.** v.177, p.78-84, 1980.

LÚCIO, W. F. *et al.* Hiperparatireoidismo secundário renal em cão. **Arq, Esc. Vet.**, v. 25, p. 59-66, 1973.

LYNCH, WR. *et al.* The effects of calcitonin on torsional properties of long bones in ovariectomized beagles. **Trans. Orthop. Res. Soc.** v.16, n.2, p.430 (abstract), 1991.

MACHADO, LHA. Estudo do hiperparatireoidismo secundário à insuficiência renal crônica em cães. Botucatu, 2000, 110p, **DISSERTAÇÃO** (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

MALLUCHE, HH *et al.* A new semiautomatic method for quantitative static and dynamic bone histology. **Calcif. Tissue Int.** v.34, p.439-48, 1982.

MARCIN, J.P., KALLAS, H.J., DIMAND, R.J. **Nutrition & metabolic support/enteral.** [Http://www.pedscm.wustl.edu/educação/all-net/english/nutripage/nutri7.html](http://www.pedscm.wustl.edu/educação/all-net/english/nutripage/nutri7.html). Acessado em 08/09/2001.

MATSUDA, J. *et al.* Participation of ovarian 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase in luteotrophic and luteolytic processes during rat pseudopregnancy. **J. Reprod. Fertil.** v.88, p.467-74, 1990.

MCCUBBREY, DA. *et al.* The effects of calcitonin on trabecular bone properties in the ovariectomized beagle. **Trans. Orthop. Res. Soc.** v.18, n1, p.53 (abstract), 1993.

MINCEY, EK, MCTAGGART, MP. Development of a radioimmunoassay for thyroxine in canines using polyethylene glycol. **Vet. Clin. Path.** v.9, p.21-7, 1980.

MOLINA-FONT, J.A. Nutrition and fetal growth. **Early Human Development.** Suppl.53, p.s51-s60, 1998.

MORITA, A. *et al.* A two-site immunochemiluminometric assay for intact parathyroid hormone and its clinical utility in hemodialysis patients. **Clinical Nephrology.** v. 38, p. 154-157, 1992.

NELSON, R.W., COUTO, C.G. **Fundamentos da medicina interna de pequenos animais.** Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p. 227-230, 1994.

NELSON, R.W. *et al.* Serum free thyroxine concentration in healthy dogs, dogs with hypothyroidism, and euthyroid dogs with concurrent illness. **JAVMA.** v.198, p. 1401-07, 1991.

NEVES, C.P., ROSSI, C.R.S., ALMEIDA, L.E.F., MORAES, I.A. Estudo comparativo entre os métodos Papanicolaou e coloração diferencial rápida (CDR) em citologia vaginal de cadelas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.** V.25, n.1, p.476-477, 2001.

ONCLIN, K. *et al.* Luteotrophic action of prolactin in dogs and the effects of a dopamine agonist, cabergoline. **J. Reprod. Fertil.** Suplemento 47, p.403-9, 1993.

ONCLIN, K., VERSTEGEN, J.P. In vivo investigation of luteal function in dogs: effects of cabergoline, a dopamine agonist, and prolactin on progesterone secretion during mid-pregnancy and -diestrus. **Domestic Animal Endocrinology.** v. 14, n. 1, p. 25-38, 1997.

ORTOLANI, E.L. Macro e microelementos. In: SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L., BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, cap. 52, p. 555-65.

PANCIERA, D.L., POST, K. Effect of oral administration of sulfadiazine and trimethoprim in combination on thyroid function in dogs. **Can. J. Vet. Res.** v.56, p.349-52, 1992.

PAULINO, CA, BONDAN, EF. Metabolismo de cálcio e fósforo. In: SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L., BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, cap. 30, p. 319-30.

PETER, AT, GAINES, JD, SMITH, CL. Association of weak estrual signs and irregular estrous cycles with hypothyroidism in a bitch. **Can. Vet. J.** v.30, p.957-958, 1989.

PETRITES-MURPHY, M. B. *et al.* Role of parathyroid hormone in the anemia of chronic terminal renal dysfunction in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 50, p. 1898-1905, 1989.

PITKIN, R.M. Calcium metabolism in pregnancy and the perinatal period. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v.151, p.99-109, 1985.

POSER, JW *et al.* Isolation and sequence of the vitamin K-dependent protein from human bone. **J. Biol. Chem.** v.255, p. 8685-92, 1980.

POWER, MJ, GOSLING, JG, FOTTRELL, PF. Radioimmunoassay of osteocalcin with polyclonal and monoclonal antibodies. **Clin. Chem.** v.35, p.1408-13, 1989.

PRICE, PA *et al.* Characterization of the γ -carboxyglutamic acid containing protein from bone. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.73, p.1447-53, 1976.

PRICE, PA, NISHIMOTO, SK. RIA for the vitamin K-dependent protein of bone and its discovery in plasma. **Proc. Natl. Acad. Sci.** V.77, p.2234, 1980.

PURSWELL, B.J., PARKER, N.A. Modern breeding management in dogs. **Vet. Med.** September, p.708-25, 2000.

REIMERS, T.J. *et al.* Effects of hemolysis and storage on quantification of hormones in blood samples from dogs, cattle, and horses. **Am. J. Vet. Res.** v.52, p.1075-80, 1991.

REIMERS, T.J. *et al.* Effects of reproductive state on concentrations of thyroxine, 3,5,3'-triiodothyronine and cortisol in serum of dogs. **Biol. Reprod.** v.31, p.148-54, 1984.

REIMERS, T.J. *et al.* Validation of radioimmunoassays for triiodothyronine, thyroxine, and hydrocortisone (cortisol) in canine, feline, and equine sera. **Am. J. Vet. Res.** v.42, p.2016-2021, 1981.

ROSOL, T. J., CAPEN, C. C. Pathophysiology of calcium, phosphorus, and magnesium metabolism in animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 26, p. 1155-1184, 1996.

ROOT KUSTRITZ, M.V. Uso de kits comerciais para ensayos de hormona luteinizante y de progesterone en el manejo reproductivo canino. In: CONCANNON, P.W., ENGLAND, G., VERSTEGEN, J. **Recent Advances in Small Animal Reproduction**. 2001. Disponível em: <http://www.ivis.org>. Acesso em: 30 jun. 2002.

SCHAEFERS-OKKENS, A.C. Ciclo estral e manejo reprodutivo da cadela sadia. In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E. C. Tratado de Medicina Interna Veterinária - doenças do cão e do gato. 5ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v. 2, cap. 157, p. 1592-1602.

SHEN, V. *et al.* Loss of cancellous bone mass and connectivity in ovariectomized rats can be restored by combined treatment with parathyroid hormone and estradiol. **J. Clin. Invest.** v.91, p.2479-87, 1993.

SILVERMAN, R., YALOW, R. S. Heterogeneity of parathyroid hormone clinical and physiologic implications. **J. Clin. Invest.**, v. 52, p. 1958-1971, 1973.

SLATOPOLSKY, E., MARTIN, K., HRUSKA, K. Parathyroid hormone metabolism and its potential as a uremic toxin. **Amer. J. Physiol.**, v. 239, p. F1-F12, 1980.

STABENFELDT, G.H., EDQVIST, L. Processos reprodutivos na fêmea. In: SWENSON, M.J. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1984, cap. 49, p.689-717.

STAINS, JP, GAY, CV. Asymmetric distribution of functional sodium-calcium exchanger in primary osteoblasts. **J. Bone Min. Res.**v.13, p.1862-69, 1998.

TANAKA, H *et al.* An enzymeimmunoassay for osteocalcin. **J. Immunol. Methods.** v.94, p.19-25, 1989.

TORRES, S.M.F., MCKEEVER, P.J., JOHNSTON, S.D. Effect of oral administration of prednisolone on thyroid function in dogs. **Am. J. Vet. Res.** v.52, p.416-21, 1991.

VANNUCCHI, C.I. Perfil das proteínas plasmáticas e de fase aguda durante a gestação e diestro: utilização no diagnóstico precoce de gestação em cadelas. São Paulo, 2000, 95p, **DISSERTAÇÃO** (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

VENZKE, W. G. Endocrinologia do carnívoro. In: GETTY, R. **Sisson/Grossman Anatomia dos Animais Domésticos**. 5ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. v. 2, cap. 54, p. 1494-1496.

VERSTEGEN, J., ONCLIN, K., SILVA, L.D.M., CONCANNON, P. Termination of obligate anoestrus and induction of fertile ovarian cycles in dogs by administration of purified pig LH. **Journal Reproduction Fertility**. v. 111, p. 35-45, 1994.

WATSON, A. D. J., CANFIELD, P. J. Renal failure, hyperparathyroidism and hypercalcaemia in a dog. **Aust. Vet. J.**, v. 55, p. 177-180, 1979.

WELLER, R. E., CLIVER, S. Renal secondary hyperparathyroidism. **Modern Veterinary Practice**. v. 62, p. 117-120, 1981.

WELLER, R. E., CULLEN, J., DAGLE, G. E. hyperparathyroid disorders in the dog: primary, secondary and cancer-associated (pseudo). **J. Small Anim. Pract.**, v. 26, p. 329-341, 1985.

WILDT, D.E., PANKO, W.B., CHAKRABORTY, P.K., SEAGER, S.W.J. Relationship of serum estrone, estradiol-17 β and progesterone to LH, sexual behavior and time of ovulation in the bitch. **Biology Reproduction**. v. 20, p. 648-658, 1979.

WILLARD, M.D. *et al.* Ketoconazole-induced changes in selected canine hormone concentrations. **Am. J. Vet. Res.** v.47, p.2504-09. 1986.

YAPHÉ, W., FORRESTER, S. D. Renal secondary hyperparathyroidism: pathophysiology, diagnosis, and treatment. **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.**, v.16, p. 173-181, 1994.

YOUNG, D.W., SARTIN, J.L., KEMPPAINEN, R.J. Abnormal canine triiodothyronine-binding factor characterized as a possible triiodothyronine autoantibody. **Am. J. Vet. Res.** v.46, p.1346-50, 1985.

ZAR, J. H.. **Bioestatistical Analysis**. Prentice-Hall. New Jersey, 718p, 1996.

Autorizo a reprodução deste trabalho.

Botucatu, novembro de 2004.

LUIZ HENRIQUE DE ARAÚJO MACHADO