

PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL

SECRETARIA DO ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS
FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO ADMINISTRATIVO – FUNDAP

MÔNICA RIBEIRO SANT'ANNA CHAVES

INFLUÊNCIA DO CICLO CIRCADIANO NAS VARIÁVEIS CELULARES E BIOQUÍMICO-SÉRICAS NO SANGUE DE CANINOS.

Monografia apresentada ao Programa de Aprimoramento Profissional /CRH/SES-SP e FUNDAP, desenvolvido junto ao Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP - Jaboticabal.

JABOTICABAL - SP
2012

C512i Chaves, Mônica Ribeiro Sant'Anna
Influência do ciclo circadiano nas variáveis celulares e bioquímico-séricas no sangue de caninos / Mônica Ribeiro Sant'Anna Chaves. -- Jaboticabal, 2012
xii, 41 f. : il. ; 29 cm

Trabalho de Conclusão (Programa de Aprimoramento Profissional/CRH/SES-SP e FUNDAP), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2012

Orientador: Aureo Evangelista Santana

Banca examinadora: Leticia Abrahão Anai, Andressa Francisca Silva Nogueira

Bibliografia

1. Canino. 2. Ciclo circadiano. 3. Hematologia. 4. Bioquímica do soro I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-072:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: A INFLUÊNCIA DO CICLO CIRCADIANO NAS VARIÁVEIS
CELULARES E BIOQUÍMICO-SÉRICAS NO SANGUE DE CANINOS

AUTOR: Mônica Ribeiro Sant'anna Chaves

ORIENTADOR: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Certificado de
Conclusão do **Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina
Veterinária e Saúde Pública**, pela Banca Examinadora:

Prof. Dr. **Aureo Evangelista Santana**
Orientador (Presidente)

Letícia Abrahão Anai

Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
FCAV/Unesp

Andressa Francisca Silva Nogueira

Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
FCAV/Unesp

Data da realização: 10/05/2012

Presidente da Banca Examinadora
Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana



Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel"

Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil - www.fcav.unesp.br
tel (16)3209-2626 - ramal 526 ou 595 - fone/fax (16)3203-1226 - e-mail: hvgln@fcav.unesp.br

DEDICATÓRIA

Gostaria de dedicar este trabalho a todas as pessoas que contribuíram para minha formação e aprendizado, e que fazem parte da minha vida.

Dedico aos meus pais, Maria do Carmo e Paulo, e meus irmãos, Thiago e Raquel, que sempre estiveram ao meu lado e, sem os quais, não haveria pilares para me sustentar.

Dedico este trabalho ao Felipe, meu companheiro e amigo, que esteve ao meu lado em todo o período da residência, me confortando e me apoiando.

À toda equipe do laboratório, em especial, ao Eugênio e Matheus, que foram minhas companhias, tão agradáveis, nestes dois anos.

Dedico também à Letícia e Andressa, que me deram muita força em minha residência e que hoje são pessoas que eu levo para toda a vida.

À Xorona, Michelle, Talita e Lesa, que me deram mais vontade de continuar e que fizeram tanta companhia nestes últimos meses.

À Alessandra (Popô), que me criou em mim a vontade de tomar esse passo, me demonstrando o quanto a residência tem o seu valor.

Dedico também a todos os amigos que aqui conquistei, e que conviveram comigo no dia a dia e que proporcionaram tantos momentos de descontração e aprendizado.

E porque não à Nina, minha gata, minha companheira, que mesmo nos dias mais difíceis, fez tirar de mim um, ou muitos sorrisos.

AGRADECIMENTOS

Neste momento especial em minha vida, gostaria de agradecer ao apoio de todas as pessoas que contribuíram com a realização deste trabalho.

À equipe do laboratório de nutrição, em especial ao Prof. Aulus, Fabiano, Flávio e Chayane, que dispuseram seus animais para a realização dos exames.

Agradeço também àqueles que me ajudaram na colheita de material dos cães: Paulo, Talita, Juarez, Xorona, Andressa.

À Andressa e Leticia, que me deram uma força e tanto na realização dos exames. Muito obrigada por aceitarem em compor a minha banca e por demonstrar a competência do trabalho de vocês.

Ao prof. Aureo, obrigada por depositar sua confiança na minha capacidade profissional e acreditar em meu trabalho.

Sempre serei muito grata. Sem vocês, nada disso seria possível.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
TÍTULO – RESUMO.....	xi
TITLE – SUMMARY.....	xii
I – INTRODUÇÃO.....	13
II – REVISÃO DE LITERATURA.....	15
Ritmo circadiano.....	15
Caninos.....	16
Avaliação de atividades enzimáticas.....	17
III – MATERIAL E MÉTODOS.....	19
Animais.....	19
Colheita de sangue.....	19
Avaliações eritroleucométricas e trombométricas.....	20
Testes bioquímico-séricos.....	21
Análise estatística.....	22
IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1. Variáveis eritroleucométricas e trombométricas.....	23
4.2. Variáveis bioquímico-séricas.....	28
V – CONCLUSÕES.....	37
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – Alanina Aminotransferase
AST – Aspartato Aminotransferase
CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CK – Creatinaquinase
DNA – Ácido desoxirribonucleico
FA – Fosfatase Alcalina
GGT – Gama Glutamiltransferase
Hb – Hemoglobina
HCM – Hemoglobina Corpuscular Média
Ht – Hematócrito
K₃-EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético Tripotássico
PT – Proteína Total
RC – Ritmo Circadiano
SDH – Sorbitol Desidrogenase
VCM – Volume Corpuscular Médio
VG – Volume Globular

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Valores de referência para hemograma de cães, estabelecidos e validados junto ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2012.....	21
Tabela 2. Valores de referência para bioquímicos de cães, estabelecidos e validados junto ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2012.....	22

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para contagens globais de hemácias, taxa de hemoglobina e hematócrito, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp - Jaboticabal/SP, 2012.....	23
Figura 2. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para contagens globais de leucócitos, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.....	24
Figura 3. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para contagens absolutas de neutrófilos bastonetes e segmentados, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.....	25
Figura 4. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para contagens absolutas de linfócitos, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.....	26
Figura 5. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para contagens absolutas de eosinófilos, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.....	26
Figura 6. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para contagens absolutas de monócitos, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.....	27
Figura 7. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para contagem de plaquetas, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.....	27

- Figura 8. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de creatinina, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.....28
- Figura 9. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de ureia, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.....29
- Figura 10. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de cálcio total, na espécie canina (n=12), em cada momento de coleta. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.....29
- Figura 11. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de fósforo, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.....30
- Figura 12. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de proteína total, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.....31
- Figura 13. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de albumina, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.....31
- Figura 14. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de ALT, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.....32

Gráfico 15. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentração sérica de fosfatase alcalina, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.....33

Figura 16. Valores médios obtidos para concentrações séricas de GGT, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.....34

Figura 17. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de AST, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.....34

Figura 18. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de colesterol, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.....35

Figura 19. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de triglicérides, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.....36

Figura 20. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de CK, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.....36

INFLUÊNCIA DO CICLO CIRCADIANO NAS VARIÁVEIS CELULARES E BIOQUÍMICO-SÉRICAS NO SANGUE DE CANINOS

RESUMO - Os exames laboratoriais são reconhecidos como importantes meios de auxílio diagnóstico na prática médico veterinária. Devido à importância e à grande demanda destes exames na rotina clínica, buscou-se avaliar a influência do ciclo circadiano na espécie canina. Para tal, foram avaliadas amostras de 12 caninos, fêmeas, da raça Beagle, em dois momentos do dia (09 e 16 horas), a fim de mensurar possíveis oscilações dos constituintes celulares do sangue e bioquímico-séricos. Com relação às variáveis eritroleucométricas, foi observada alteração significativa ($p < 0,05$) na contagem de hemácias, concentração de hemoglobina e hematócrito. De outra parte, dos 13 constituintes bioquímico-séricos avaliados observaram-se variações significativas para proteína total, albumina, cálcio, fósforo, colesterol, aspartato aminotransferase e fosfatase alcalina. Diante dos resultados obtidos neste ensaio, é possível afirmar que há variação de certas características eritrométricas e bioquímico-séricas ao longo do dia, mas que se mantiveram dentro dos valores referenciados para a espécie canina.

Palavras-chave: canino, ciclo circadiano, hematologia, bioquímica do soro

THE INFLUENCE OF THE CIRCADIAN CYCLE ON THE CELLULAR AND SERUM BIOCHEMICAL VARIABLES ON CANINES' BLOOD

SUMMARY - Laboratory tests are recognized as important means of diagnostic aid in the veterinary medical practice. Due to the importance and great demand for these tests on clinical routine, the influence of the circadian cycle on the canine species has been evaluated. For that purpose, samples from 12 canines, Beagle females, were evaluated in two distinct moments of the day (9 am and 4 pm), in order to measure possible oscillations of the blood cellular constituents and serum-biochemicals. Regarding the eritroleucometric variables, it was observed important alteration ($p < 0,05$) in the erythrocytes count, hemoglobin concentration and hematocrit. On the other hand, from the 13 serum-biochemical constituents that were evaluated, it was observed significant variations for total protein, albumin, calcium, phosphorus, cholesterol, aspartate aminotransferase, and alkaline phosphatase. Considering the results of this essay, it is possible to affirm that there is variation of certain erythrometric and serum-biochemical characteristics along the day, but they kept within the reference values for the canine species.

Keywords: canine, circadian cycle, hematology, serum biochemistry

I – INTRODUÇÃO

Estima-se que a população mundial de cães ultrapasse 600 milhões de animais e, segundo a Associação Nacional de Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação, o Brasil possui a segunda maior população de cães do planeta, com cerca de 31 milhões de caninos.

O elevado número de cães em nosso país gera grande movimento econômico, que repercute socioculturalmente, além dos importantes reflexos na área de saúde pública. O mercado pet é o segundo colocado no ranking mundial e movimenta mais de US\$ 9 bilhões por ano na economia brasileira (REVISTA ÉPOCA, 2010). Além disso, o cão possui características que o destaca em algumas atividades tais como guia para cegos, assistência aos deficientes auditivos, guarda, caça e companhia, neste último caso onde se encaixa a maioria.

Sua grande proximidade com o ser humano impõe necessidades sempre presentes de cuidados relacionados à saúde pública, uma vez que podem atuar como vetores de doenças consideradas zoonoses (como raiva, leishmaniose, leptospirose, escabiose, dermatomicose, esporotricose, dentre outras).

Os caninos representam a maioria dos pacientes atendidos em grande parte de hospitais e clínicas veterinárias em todo o Brasil (PINTO, 1998; CORRÊA et al, 2008). Assim sendo, torna-se necessária a realização de estudos mais verticalizados, para compreensão das variações que ocorrem no organismo destes animais, especialmente aquelas que, em condições fisiológicas, se fazem presentes durante os ciclos de vigília e sono.

As pesquisas sobre a influência do ciclo circadiano nas concentrações de células e constituintes bioquímico-séricos são escassas e em sua maioria com enfoque no ser humano, sendo poucas em animais domésticos. Está bem estabelecido que o ciclo circadiano altera os valores dos constituintes celulares e bioquímicos do sangue, ao longo do dia, e que tal informação é de fundamental importância ao clínico veterinário na detecção de distúrbios funcionais e estruturais de certos órgãos ou

sistemas orgânicos. Ensaio para avaliação da variabilidade dos parâmetros fisiológicos de animais domésticos, sadios, são primordiais para análise das alterações patológicas na rotina do atendimento médico-veterinário, principalmente na espécie canina que apresenta grande demanda por assistência na prática veterinária. Neste sentido, é imprescindível a realização de estudos da influência do ritmo circadiano nas variáveis hematológicas e bioquímico-séricas do cão, tendo em vista a importância da população canina no Brasil, sua susceptibilidade a um amplo leque de enfermidades, além da inestimável importância dos exames clínico-patológicos e sua adequada interpretação como auxílio no diagnóstico.

II – REVISÃO DE LITERATURA

RITMO CIRCADIANO

Processos e funções biológicas são passíveis de variações rítmicas, as quais são atribuídas à necessidade de manutenção do meio interno. O conceito de homeostase tem sofrido modificações às custas de dados emergentes do campo da cronobiologia, que é definida como um espaço multidisciplinar para entender a dimensão temporal da vida, sendo reconhecida pelo estudo dos fenômenos biológicos.

Os mecanismos biológicos exibem variabilidade cíclica previsível no tempo, o que tem permitido uma reavaliação das práticas médicas atuais através do estudo mais aprofundado do ritmo circadiano (RC) e dos mecanismos que geram as oscilações sustentadas em todos os níveis biológicos. O RC é um mecanismo endógeno que comanda praticamente todas as relações fisiológicas periódicas do organismo, com duração aproximada de 24 horas. O ritmo sono-vigília e a produção e secreção diária dos hormônios são evidências do funcionamento cíclico do organismo. Segundo HARKER (1958), a característica de maior interesse no estudo de ritmo de 24 horas, não é o fato de certas atividades ocorrerem todas neste intervalo, mas, sim, que tais repetições persistem na ausência de mudanças ambientais. Dessa maneira podem ser observados dois tipos de ritmos - aqueles que ocorrem como resposta imediata às mudanças no ambiente (ritmos exógenos) e os que persistem quando as condições no ambiente são mantidas constantes (ritmos endógenos).

Os ritmos biológicos, segundo CIPOLLA-NETO et al. (1988), podem ser estudados através da cronobiologia. Assim, o ritmo biológico que está presente em todos os seres vivos (devido ao seu caráter ubíquo), parece ter-se originado desde os primórdios da vida, tendo contribuído como fator organizador da matéria viva. Portanto, a ritmicidade encontrada em animais e plantas não é apenas expressão reflexa dos eventos temporais do meio externo, mas possui um caráter endógeno,

sendo determinado geneticamente. REFINETTI (2012) afirma que mutações em um único gene têm sido descritas afetando o ritmo circadiano.

WITHROW (1959) introduziu o termo circadiano para caracterizar os ritmos com períodos de 24 horas, os quais são sincronizáveis em ciclos de 24 horas de claro/escuro, sendo que diferentes espécies apresentam diferentes ritmos circadianos REFINETTI (2012).

No estudo do ritmo circadiano podem ser destacados dois objetivos principais. O primeiro seria a demonstração de que qualquer variável fisiológica não se mantém estável e constante durante 24 horas, apresentando uma flutuação diária regular, filogeneticamente incorporada e geneticamente determinada, cuja finalidade seria preparar o organismo de uma maneira antecipada para enfrentar modificações ambientais, como a alternância do dia e da noite; o segundo objetivo seria mostrar que as alterações circadianas não se dão apenas ao nível da variável observada, mas também e principalmente, em face da capacidade do organismo em reagir diante de estímulos ambientais e endógenos. Além disso, dependendo da hora e do dia, os organismos podem apresentar diferenças fisiológicas e comportamentais, podendo responder de maneira diferente aos estímulos (CIPOLLA-NETO et al., 1988).

CANINOS

O sangue canino é composto por 80% de água, além de hemoglobina, glicose e eletrólitos incluindo sódio, potássio, cálcio, magnésio, ferro e cloreto, dentre outros. Já a fração plasmática é constituída por cerca de 93% de água, 5 a 7% de proteínas, além de conter muitos íons tais como o sódio, cloreto, carbonato, dentre outros. Além disso, apresenta uma pequena quantidade de gases em solução, glicose, aminoácidos, lipídeos, algumas vitaminas e metabólitos (como ureia e creatinina). Hormônios também estão presentes, mas em pequenas quantidades (STEPHENSON, 2004).

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

A enzimologia clínica fez grandes avanços desde a introdução da fosfatase alcalina (FA) como auxílio diagnóstico em 1934, por King e Armstrong. Da mesma forma, avanços na bioengenharia e informática ligada à enzimologia, imunologia e genética molecular vieram introduzir novos procedimentos clínicos de diagnóstico. Imunodiagnósticos, e diagnósticos não-radioisotópicos, qualitativos e quantitativos com enzima ligada ao anticorpo monoclonal aumentaram a sensibilidade e a especificidade dos testes para metabólitos, hormônios e agentes infecciosos. A Imunocitoquímica aumentou a especificidade e a sensibilidade da microscopia fotônica, ou de luz, bem como da histologia e citologia no âmbito da microscopia eletrônica. O advento das endonucleases combinadas com sondas de DNA tem permitido a detecção de impressões digitais de defeitos genéticos prepatentes e agentes infecciosos com ou sem o auxílio de anticorpos endógenos. Embora as enzimas pareçam ter apenas uma parte passiva nessas formas de biotecnologia, entender a sua ação principal é essencial para o diagnóstico clínico e pesquisa básica.

Algumas variáveis estudadas no contexto das análises laboratoriais, como a alanina aminotransferase específica (ALT-específica), que indica atividade hepática em cães, suínos, equinos, bovinos, ovinos ou caprinos, têm se mostrado insuficiente como valor diagnóstico. A atividade da creatinaquinase (CK), em fluido cefalorraquidiano, encontra-se elevada em doenças desmielinizantes e neoplasias encefálicas dos cães, gatos, bovinos e equinos, mas a sensibilidade deste aumento não está clara (SMITH & HEALY, 1968; EDWIN, 1970; EDWIN & JACKMAN, 1974; EVANS et al., 1975; MAYHEW et al., 1977; FURR & TYLER, 1990).

Concentrações séricas basais, e hepáticas, de gama glutamiltransferase (GGT) revelam-se muito baixas em cães e ratos, em comparação a ruminantes, equinos e cobaias. Colostro de vaca, ovelha e coelha, mas não aquele da égua, contém uma grande quantidade de GGT.

PICCIONE et al (2008) afirmam que oscilações diárias das variáveis bioquímico-séricas, hematológicas e fisiológicas, em diversas espécies, já foram verificadas. Além

disso, estudos realizados por TOUITOU e colaboradores (1986), evidenciaram que há variação nos valores do hematócrito, contagem de hemácias e hemoglobina, e proteínas plasmáticas totais em humanos ao longo do dia.

Assim, com base nestes estudos, idealizou-se este ensaio com o objetivo principal de verificar possíveis variações atribuíveis ao RC, em cães, analisando-se variáveis eritroleucométricas e bioquímico-séricas.

III – MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS

Foram utilizados 12 caninos adultos, fêmeas, da raça Beagle, pesando entre 12 e 15 Kg, considerados clinicamente hígidos após avaliação do seu estado geral e, somente estes foram incluídos no ensaio em questão. Os animais eram mantidos no Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada” da FCAV/Unesp, Jaboticabal/SP, sob um esquema homogêneo de alimentação e atividade física.

Os animais tinham acesso livre à água e recebiam alimentação uma vez ao dia, às 16:30h, após a segunda colheita de sangue.

As amostras de sangue foram colhidas em tubos de ensaio contendo ácido etilenodiaminotetracético tripotássico (K_3 -EDTA), assim como em tubos desprovidos de anticoagulante para sinérese e posterior obtenção do soro sanguíneo. Tais amostras, bem acondicionadas e refrigeradas, foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto”, do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, FCAV/Unesp - Câmpus de Jaboticabal, onde foram devidamente processadas para obtenção do hemograma e das variáveis bioquímico-séricas.

Todos os animais eram acostumados à manipulação e colheita de sangue, de tal forma a permanecerem tranquilos durante o procedimento da referida colheita.

COLHEITA DE SANGUE

As amostras de sangue foram colhidas por venipunção jugular utilizando-se de agulhas (25 x 8) e seringas (10 mL) descartáveis. As colheitas foram realizadas em dois momentos distintos, às 09:00 e 16:00 horas, no decorrer de um único dia, sendo colhidos 3,0 mL de sangue acondicionados em tubos de ensaio contendo K_3 -EDTA, para realização do hemograma, e 5,0 mL sem anticoagulante para posterior sinérese e

obtenção do soro com vistas aos testes bioquímico-séricos (atividades das enzimas AST, ALT, FA, GGT, CK, e concentrações de ureia, creatinina, cálcio total, fósforo, triglicérides, colesterol, proteínas totais e albumina).

AVALIAÇÕES ERITROLEUCOMÉTRICAS E TROMBOMÉTRICAS

As contagens globais de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, assim como as determinações do volume globular (VG) ou hematócrito (HT), taxa de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram obtidas com o auxílio de um contador automático de células ABC Vet (HORIBA ABX, França). As contagens diferenciais de leucócitos foram obtidas a partir do exame microscópico de esfregaços sanguíneos corados com mistura de Metanol, May-Grunwald, Giemsa e Wright. Como valores de referência utilizaram-se aqueles estabelecidos e validados junto ao “Laboratório de Patologia Clínica Veterinária Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto”, do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, FCAV/Unesp, Campus de Jaboticabal (Tabela 1).

TABELA 1. Valores de referência para hemograma de cães, estabelecidos e validados junto ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2012.

ERITROGRAMA		
Hemácias	$\times 10^6/\mu\text{L}$	5,5 - 8,5
Hemoglobina	g/dL	12 – 18
Hematócrito	%	37 – 55
VCM	fL	60 – 77
CHCM	g/dL	31 – 34
Plaquetas	$\times 10^3/\mu\text{L}$	180 – 400
LEUCOGRAMA	Valores relativos (%)	Valores absolutos (células/μL)
Leucócitos		6000 – 18000
Basófilos	0 - 1	0 – 0
Eosinófilos	2 - 10	120 - 1800
Neutrófilos bastonetes	0 - 3	0 - 500
Neutrófilos segmentados	60 - 77	3600 - 13800
Linfócitos	13 - 30	720 - 5400
Monócitos	3 - 10	180 - 1800

TESTES BIOQUÍMICO-SÉRICOS

As atividades séricas da AST e ALT foram avaliadas pelo método de Reitman – Frankel (1957); FA pelo método de Roy (1970) modificado; GGT espectrofotométrica pelo método de Szsaz (1969) modificado; ureia (UV) cinética pelo método de Diacetilmonoxima modificado e creatinina pelo método de Lustosa-Basques; creatinaquinase (CK) cineticamente pelo método IFCC; proteínas totais pelo método do Biureto, albumina pelo Verde de Bromocresol; cálcio colorimétrico pelo CPC – Cresolftaleina; fósforo pelo método de Darley e Ertingshausen modificado; colesterol colorimétrico pelo método enzimático de Trinder e triglicérides colorimétrico pela Reação de Trinder.

As análises foram realizadas em duplicata e amostras lipêmicas ou hemolisadas foram invariavelmente descartadas.

Os valores de referência utilizados (Tabela 2) e todas as análises supracitadas foram conduzidas de acordo com o esquema de trabalho instituído no Laboratório de

Patologia Clínica Veterinária “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto”, do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, FCAV/Unesp - Câmpus de Jaboticabal.

TABELA 2. Valores de referência para bioquímicos de cães, estabelecidos e validados junto ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2012.

PARAMETROS BIOQUÍMICOS		
Albumina	g/dL	2,6 - 4,0
ALT	U/L	10 - 88
AST	U/L	10 - 88
Cálcio	mg/dL	8,6 - 11,2
CK	U/L	20 - 200
Colesterol	mg/dL	125 - 270
Creatinina	mg/dL	0,5 - 1,5
Fosfatase Alcalina	U/L	20 - 150
Fósforo	mg/dL	2,2 - 5,5
GGT	U/L	1 - 10
Proteína Total	g/dL	5,8 - 7,9
Triglicérides	mg/dL	27 - 115
Ureia	mg/dL	15 - 65

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores médios e respectivos desvios-padrão e coeficientes de variação para características celulares e bioquímico-sélicas, obtidos neste ensaio, foram estatisticamente analisados dentro do programa Graphpad Instat versão três. Em princípio, os resultados foram submetidos à análise de variância, sendo o contraste entre as médias estabelecido pelo teste t, para características homogêneas (amostras dependentes), com nível de significância de 5% (BERQUÓ et al., 1981).

IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Variáveis eritroleucométricas e trombométricas

As variáveis eritrométricas apresentaram alteração significativa ($p < 0,03$) entre os horários de colheita, sendo que os valores obtidos para contagem de hemácias, hematócrito e hemoglobina foram maiores durante o período da manhã (Figura 1). Corroborando estes achados, TOUITOU et al (1986) e POCOCK et al (1989), através de um estudo em seres humanos, associaram essa tendência às variações circadianas do plasma.

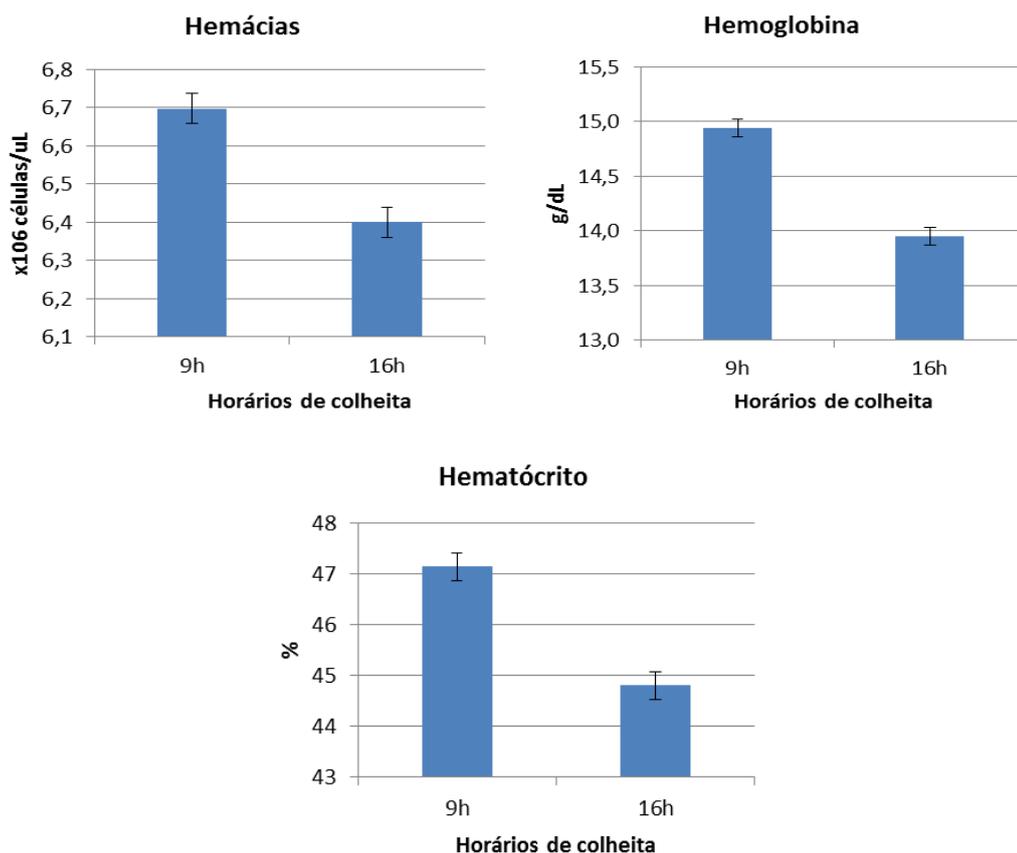


FIGURA 1. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para contagens globais de hemácias, taxa de hemoglobina e hematócrito, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp - Jaboticabal/SP, 2012.

Os valores de leucócitos obtidos nos períodos da manhã e tarde não apresentaram variação significativa e mantiveram-se muito próximos. Observou-se que, no período da manhã, os valores médios absolutos de leucócitos apresentaram-se discretamente superiores aos da tarde (Figura 2). Este achado está em desacordo com aqueles de POCOCK et al (1989), assim como LILLIEHÖÖH (1997), posto que, em seus ensaios, com seres humanos e cães, respectivamente, observaram contagens globais de leucócitos mais elevadas no período da tarde. Segundo POCOCK et al (1989), o aumento nas contagens globais de leucócitos observado foi atribuído aos exercícios físicos.

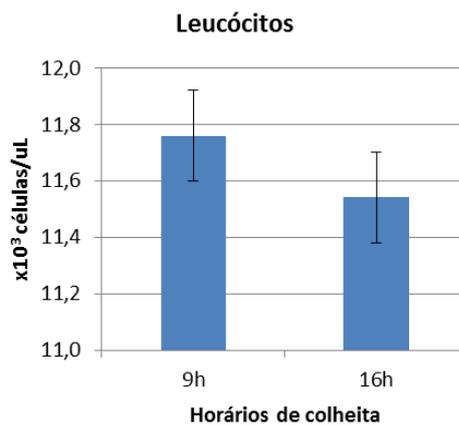


FIGURA 2. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para contagens globais de leucócitos, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.

Assim como na contagem global de leucócitos, os valores médios e erros-padrão da média, obtidos para as contagens absolutas de cada variedade leucocitária não apresentaram diferenças significativas entre os períodos de observação, matutino e vespertino. Os números absolutos de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos mantiveram-se constantes e sem variação significativa, o que pode ser verificado nas Figuras 3, 4, 5 e 6, respectivamente. Não foram observados basófilos nos esfregaços realizados em ambos os momentos de colheita.

LILLIEHÖÖH (1997) observou aumento do número de neutrófilos durante o dia, com valores máximos no fim da tarde. Inversamente, neste estudo, a quantidade de neutrófilos, bastonetes e segmentados, diminuiu com o passar do dia, como pode ser observado na Figura 3. Ainda assim, os valores mantiveram-se dentro dos padrões de normalidade.

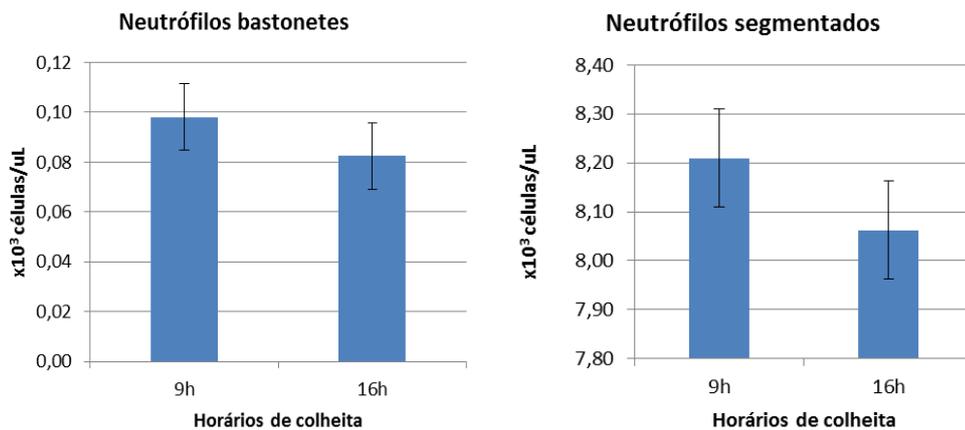


FIGURA 3. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para contagens absolutas de neutrófilos bastonetes e segmentados, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.

Também, LILLIEHÖÖH (1997) descreveu valores máximos de linfócitos no final da noite, asseverando um aumento dessas células ao longo do dia. Mais uma vez, neste ensaio, os resultados encontrados diferem dos do autor citado, uma vez que o número de linfócitos permaneceu entre 2,10 e 2,14x10³ células/ μ L nas duas colheitas (Figura 4).

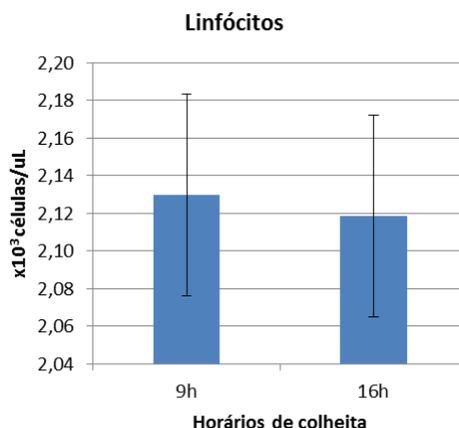


FIGURA 4. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para contagens absolutas de linfócitos, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.

As contagens absolutas de eosinófilos mantiveram-se constantes ao longo do dia com discreta elevação, não significativa, do número de células no período da tarde (Figura 5), o que, segundo LILLIEHÖÖH (1997), deve-se provavelmente ao baixo número de eosinófilos na circulação sanguínea, o que os torna difíceis de serem detectados.

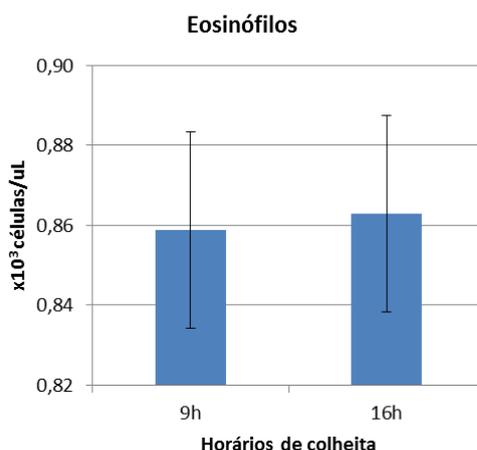


FIGURA 5. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para contagens absolutas de eosinófilos, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.

O número de monócitos diminuiu após a primeira coleta (Figura 6), mas manteve-se dentro dos valores de normalidade para a espécie.

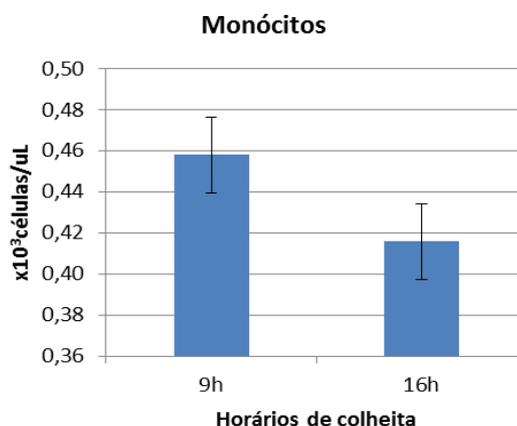


FIGURA 6. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para contagens absolutas de monócitos, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.

Em um estudo feito com ratos, HUI et al (1994) notaram diminuição na contagem de plaquetas na medida em que a jornada evoluiu da manhã para o período da tarde. Contrariamente, tomando-se como base os resultados deste ensaio, a contagem de plaquetas no período vespertino foi 3,1% maior que em relação ao período matutino, como mostra a Figura 7.

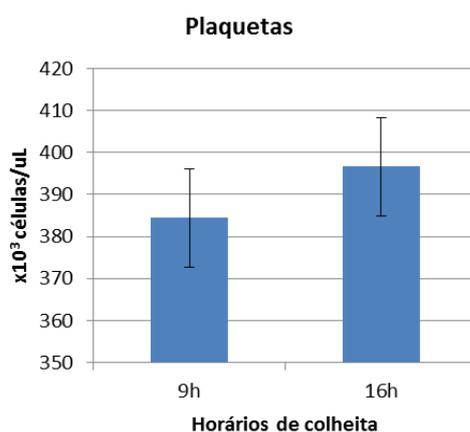


FIGURA 7. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para contagem de plaquetas, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.

4.2. Variáveis bioquímico-sélicas

Dentre os resultados bioquímico-sélicas, as concentrações sélicas de creatinina e ureia não apresentaram resultados significativos à análise estatística, mas seus valores elevaram-se, ligeiramente, no período da tarde (Figuras 8 e 9), corroborando os resultados encontrados por POCOCK et al (1989).

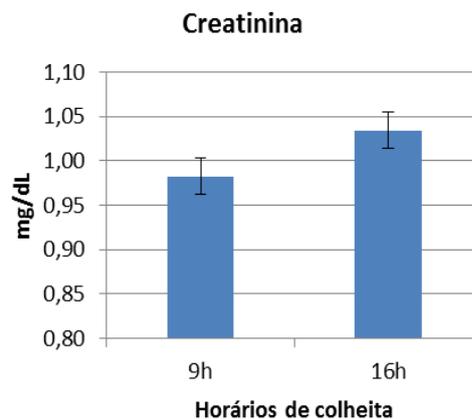


FIGURA 8. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações sélicas de creatinina, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.

GIUDICE et al (2009) constataram influência do efeito do tempo nos valores de creatinina, estudando cães, machos, da mesma raça que aqueles aqui ensaiados. Ademais, estes autores observaram uma relação temporal entre a concentração sélica de creatinina e os ciclos de alimentação e jejum, sugerindo que a ingestão de alimento seja um gatilho fisiológico para a síntese e secreção de creatinina. Como no estudo em tela foram utilizadas somente fêmeas, em jejum alimentar, esta variação pode não ter sido observada já que os animais não ingeriram alimento entre os horários de colheita.

Quanto às concentrações sélicas de ureia, WINKEL et al (1975) observaram diminuição destes valores ao longo do dia, diferentemente da tendência observada na Figura 9.

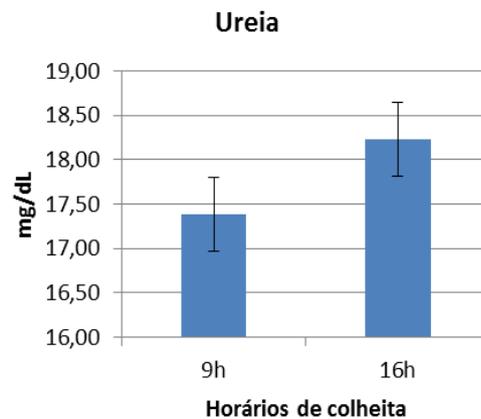


FIGURA 9. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de ureia, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.

WINKEL et al (1975) asseveraram, após seus estudos com diversos constituintes séricos e RC, não haver nenhuma variação significativa da concentração sérica de cálcio ao longo do dia em humanos. Contrariamente, os valores obtidos para o cálcio sérico total, no presente trabalho, aumentaram significativamente ($p < 0,01$) no período da tarde, como pode ser observado na Figura 10.

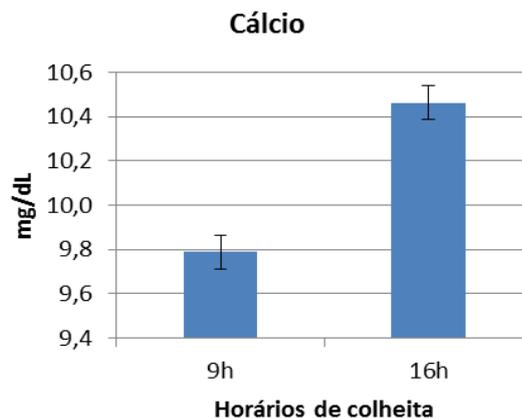


FIGURA 10. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de cálcio total, na espécie canina (n=12), em cada momento de coleta. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.

De outra parte, no caso do fósforo sérico, seus valores médios variaram significativamente nos diferentes períodos de observação, com maiores valores

observados pela manhã (Figura 11). Diferentemente, POCOCK et al (1989) encontraram valores crescentes de fósforo ao longo do dia .

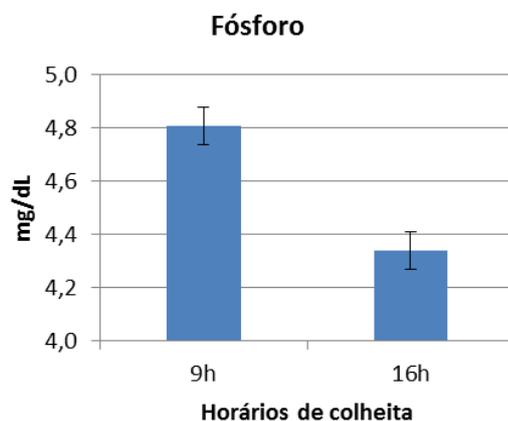


FIGURA 11. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de fósforo, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.

A exemplo do fósforo, a proteína total também apresentou concentrações mais elevadas no período da manhã quando comparado ao período da tarde. Ao observarmos a Figura 12 podemos observar que os valores de PT tiveram uma ligeira queda no período da tarde, com uma diferença de 0,25g/dL entre as médias, estatisticamente significativa. Este resultado não coincide com aquele encontrado no estudo de WINKEL et al (1975) em humanos, que notaram discreto aumento de PT ao longo do dia.

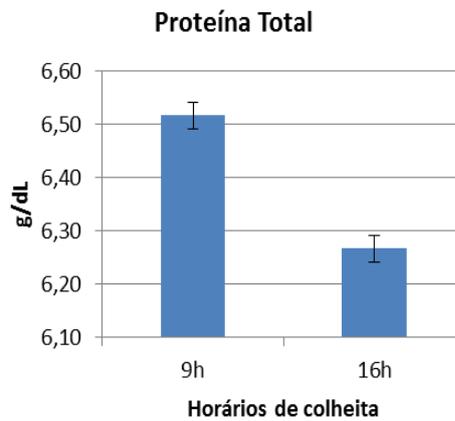


FIGURA 12. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de proteína total, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.

As concentrações séricas de albumina, no período da tarde, apresentaram um acréscimo de 5,4% do valor inicial (Figura 13), estatisticamente significativo ($p < 0,01$), assim como observado por WINKEL et al (1975) em humanos.

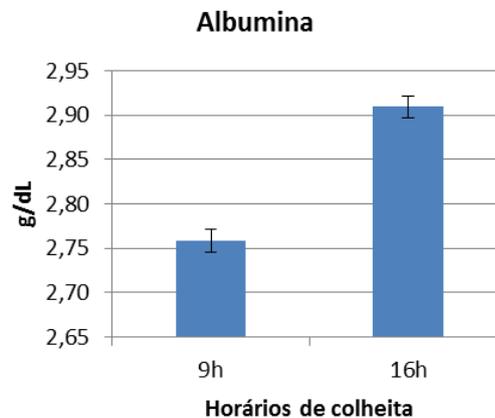


FIGURA 13. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de albumina, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.

Os valores médios obtidos para ALT, não expressaram diferenças significativas entre os dois momentos de colheita. Os valores tenderam ao equilíbrio durante o dia,

mantendo-se praticamente constantes (Figura 14). KOUDELA et al (1969), avaliando esta enzima em galinhas, encontraram grandes variações de ALT ao longo do dia.

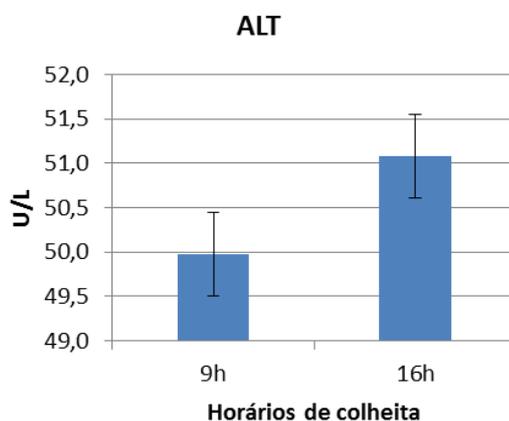


FIGURA 14. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de ALT, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.

No caso da fosfatase alcalina, cujas médias e erros-padrão estão apresentados na Figura 15, verificou-se diminuição de 4,85U/L entre as médias inicial e final, que apresentou-se significativa ($p < 0,02$). THOMPSON et al (1989) observaram que a atividade plasmática da fosfatase alcalina, em ratos, teve diminuição acentuada ao longo do dia, e que os maiores valores foram obtidos pela manhã. Resultados semelhantes foram observados no presente estudo, sendo as concentrações de FA significativamente maiores às 09 horas.

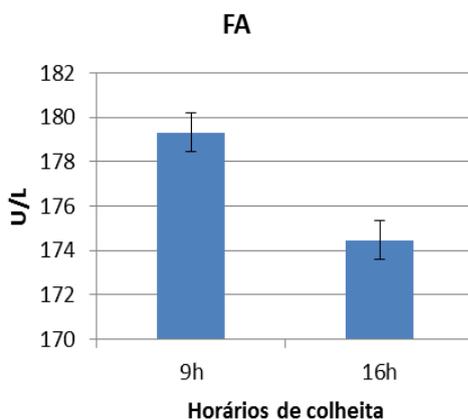


FIGURA 15. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentração sérica de fosfatase alcalina, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.

De acordo com WHITE et al (1987), a enzima gama-glutamiltransferase, em camundongos, não sofre influência do ciclo de luz. Em concordância, neste trabalho, não foram observadas alterações dos valores enzimáticos de GGT ao longo do dia. Como pode ser observado na Figura 16, todas as amostras apresentaram o mesmo valor (7,65U/L) em ambas as colheitas. Isso se deve ao fato do kit de GGT possuir alto fator de correção, o que faz com que leituras próximas tendam a apresentar o mesmo valor.

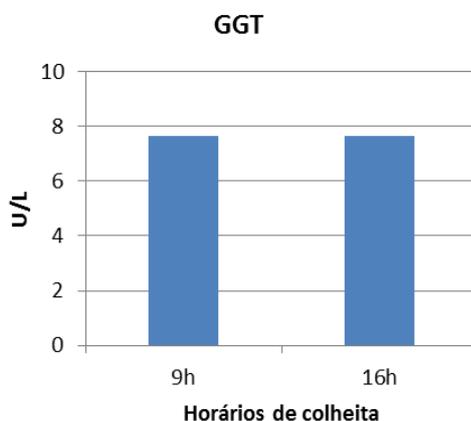


FIGURA 16. Valores médios obtidos para concentrações séricas de GGT, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.

A enzima AST teve um aumento médio de 32% de sua atividade durante o período vespertino, o qual se mostrou significativo ($p < 0,03$). KOUDELA et al (1969), em um estudo com galinhas, observaram variações significativas das atividades de AST, sendo que os maiores valores foram registrados às 18 horas. Tal observação é fartamente corroborada pelos achados deste ensaio, cujos caninos estudados também apresentaram maiores valores de AST no período da tarde (Figura 17).

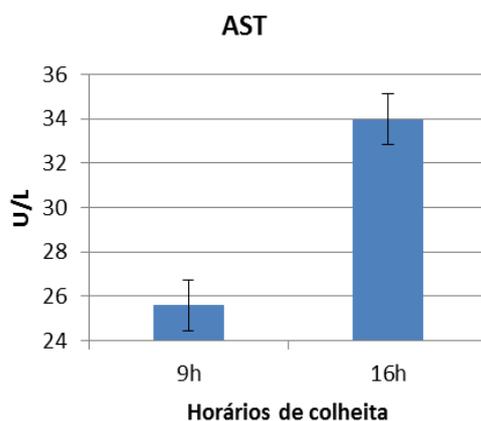


FIGURA 17. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de AST, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.

Valores mais elevados de colesterol foram observados no período matutino (Figura 18), contrariamente à RIVERA-COLL et al (1994) que obtiveram um ritmo de 12 horas significativo para o colesterol, em humanos, com valores máximos registrados no período vespertino.

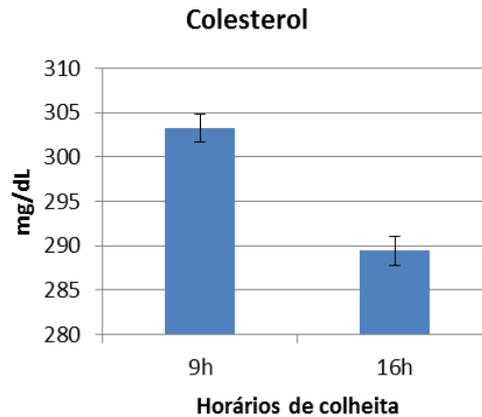


FIGURA 18. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de colesterol, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.

O triglicérides não apresentou variações estatísticas significativas quando suas médias foram comparadas. Ainda assim, é possível observar, na Figura 19, que os valores médios obtidos para esta variável se mostraram maiores no período da tarde, tal qual observado por POCOCK et al (1989).

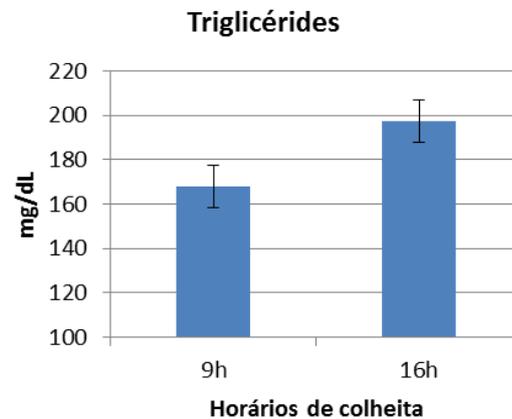


FIGURA 19. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de triglicérides, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.

A diferença da atividade da enzima CK entre os dois momentos de colheita, apresentada na Figura 20, não proporcionou resultados estatisticamente significativos.

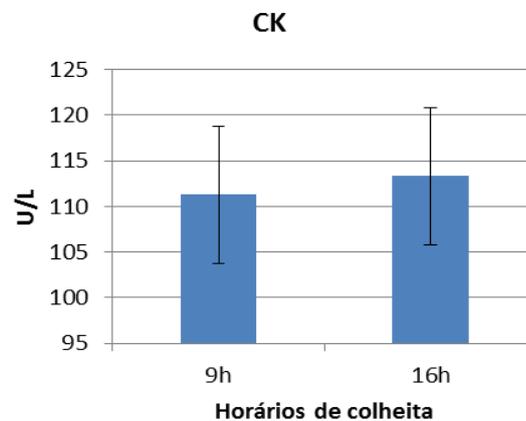


FIGURA 20. Valores médios e erros-padrão das médias, obtidos para concentrações séricas de CK, na espécie canina (n=12), em cada momento de observação. Unesp – Jaboticabal/SP, 2012.

Vale ressaltar que, nos estudos de GUTENBRUNNER (2000) em humanos, as variações na atividade sérica da CK foram observadas apenas durante o aumento da atividade física, voltando aos valores basais, decorrido certo tempo.

V – CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos neste experimento, concluiu-se que o ritmo circadiano exerce influência nas variáveis hematológicas e bioquímico-séricas. Estudos mais detalhados, quanto ao número de animais, idade, sexo e estabelecimento dos horários de coletas devem ser bem representados e priorizados, minimizando os fatores de interferência na avaliação da influência do ciclo circadiano sob os processos biológicos orgânicos.

VI – REFERÊNCIAS

BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P.; GOTLIEB, S. L. D. **Bioestatística**. São Paulo, Ed. Pedagógica e Universitária, 323 p., 1981.

CIPOLLA -NETO, J.; MARQUES, N.; MENNA, L. S. **Introdução ao estudo da cronobiologia**. São Paulo, Icone Edusp, XIV+270p, 1988.

CORRÊA, T. P.; VALLE, M. C. A. D.; BATTAGLIA, L. A.; PONCE, F. G. **Estudo retrospectivo dos pacientes internados no Hospital Veterinário Pompéia durante o período de janeiro a dezembro de 2007**. Pesquisa Veterinária Brasileira 28 (Supl.), 2008.

EDWIN, E. E. Plasma enzyme and metabolite concentrations in cerebrocortical necrosis. **The Veterinary Record**, Londres, v. 87, p. 396-398, 1970.

EDWIN, E. E.; JACKMAN, R. A rapid radioactive method for determination of thiaminase activity and its use in the diagnosis of cerebrocortical necrosis in sheep and cattle. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 25 (4), p. 357-368, 1974.

EVANS, W. C.; EVANS, I. A.; HUMPHREYS, D. J.; LEWIN, B.; DAVIES, W. E.; AXFORD, R. F. Induction of thiamine deficiency in sheep, with lesions similar to those of cerebrocortical necrosis. **Journal of the Comparative Pathology**, v. 85 (2), p. 253-267, 1975.

FURR, M. O.; TYLER, R. D. Cerebrospinal fluid creatine kinase activity in horses with central nervous system disease - 69 cases (1984-1989). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 197 (2), p. 245-248, 1990.

GIUDICE, E.; GIANNETTO, C.; FAZIO, F.; PICCIONE, G. Daily rhythm of creatinine in dog: clinical and diagnostic significance. **Biological Rhythm Research**, v. 40 (2), p. 181-187, 2009.

GUTENBRUNNER, C. Circadian variations of the serum creatine kinase level – a masking effect?. **Chronobiology international**, v. 17 (4), p. 583-590, 2000.

HARKER, J.E. Diurnal rhythms in the animal Kingdom. **Review of Biology**, Chicago, v. 33 (1), p. 1-52, 1958.

HUI, W.; MANQING, X. Diurnal variation on the effect of hemogram in rat. **Journal of Guangdong Medical College**, China, v. 2, 1994.

HORNEY, B. S.; HONOR, D.J.; MACKENZIE, A.; BURTON, S. Stability of Sorbitol Dehydrogenase Activity in Bovine and Equine Sera. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 22 (1), p. 5-9, 1993.

KING, E. J.; ARMSTRONG, A. R. A convenient method for determining serum and bile phosphatase activity. **Canadian Medical Association Journal**, v. 31 (4), p. 376-381, 1934.

KOUDELA, K.; SOVA, Z.; VOSYKA, V. Daily Rhythms of the Activity of Aspartate Aminotransferase (GOT) /2.6.1.1/ and Alanine Aminotransferase (GPT) /2.6.1.2./ in a Homogenate of Chicken Liver. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 16 (3), p. 215-219, 1969.

LILLIEHÖÖK, I. Diurnal variation of canine blood leukocyte counts. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 26 (3), p. 113-117, 1997.

MAYHEW, I. G.; WHITLOCK, R. H.; TASKER, J. B. Equine cerebrospinal fluid: reference values of normal horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38 (8), p. 1271-1274, 1977.

PICCIONE, G.; ASSENZA, A.; FAZIO, F.; BERGERO, D.; CAOLA, G. Daily rhythms of serum vitamin D-metabolites, calcium and phosphorus in horses. **Acta Veterinaria Brno**, v. 77 (2), p. 151-157, 2008.

PINTO, L. F. **Casuística ambulatorial do serviço de homeopatia do hospital veterinário da UFRRJ** Disponível em: <http://www.ihb.org.br/BR/docs/revista/v.4.n.2-1998/pdf/p.542-547.pdf>. Acesso em 24 abril 2011.

POCOCK, S. J.; ASHBY, D. SHAPER, A. G.; WALKER, M.; BROUGHTON, P. M. G. Diurnal variations in serum biochemical and haematological measurements. **Journal of Clinical Pathology**, v. 42, p. 172-179, 1989.

REFINETTI, R. **Circadian rhythms**. Disponível em: <http://www.circadian.org/biorhyt.html>. Acesso em 14 fevereiro 2012.

REVISTA ÉPOCA SÃO PAULO on line. Disponível em: <http://revistaepocas.globo.com/Revista/Epoca/SP/0,,EMI134453-17276,00-PET+FASHION+WEEK+REALIZA+DESFILE+CANINO.html>. Acesso em 23 de abril 2010.

RIVERA-COLL, A.; FUENTES-ARDERIU, X.; DÍEZ-NOGUERA, A. Circadian rhythmic variations in serum concentrations of clinically important lipids. **Clinical chemistry**, v.40 (8), p. 1549-1453, 1994.

SMITH, J. B.; HEALY, P. J. Elevated serum creatine phosphokinase activity in diseases of the central nervous system in sheep. **Clinica Chimica Acta**, v. 21, p. 295-296, 1968.

STEPHENSON, R. B. **Visão geral da função cardiovascular**. In: CUNNINGHAM, J. G. Tratado de fisiologia veterinária. 3 ed. Guanabara Koogan, 579 p., 2004.

THOMPSON, C. S.; MIKHAILIDISI, D. P.; GILLI, D. S.; JEREMYI, J. Y.; BELLI, J. L. & DANDONAI, P. Effect of starvation and sampling time on plasma alkaline phosphatase activity and calcium homeostasis in the rat. **Laboratory animals**, v. 23 (1), p. 53-58, 1989.

TOUITOU, Y. et al. Differences between young and elderly subjects in seasonal and circadian variations of total plasma proteins and blood volume as reflected by hemoglobin, hematocrit, and erythrocyte counts. **Clinical Chemistry**, Washignton, v. 32, p. 801-804, maio 1986.

WHITE, B. P.; DAVIES, M. H.; SCHNELL, R. C. Circadian variations in hepatic glutathione content, γ -glutamylcysteine synthetase and γ -glutamyl transferase activities in mice. **Toxicology Letters**, v. 35, p. 217-223, 1987.

WINKEL, P.; STATLAND, B. E.; BOKELUND, H. The effects of time of venipuncture on variation of serum constituents. Consideration of within-day and day-to-day changes in a group of healthy young men. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 64(4), p. 433-447, 1975.

WITHROW , R.B. Photoperiodism and Related Phenomenain Plants and Animals.
American Association for the Advancement of Science, Washington, XIII+431p.,
1959.