

**Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro**

**Relação entre Tratamentos Metabólicos Pré e Pós-Parto nos Níveis  
de Cálcio, Magnésio e Incidência de algumas Doenças Puerperais  
em Vacas Leiteiras da Ilha Terceira e Barcelos**

**-Versão Final-**

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Sara Ermelinda Lemos Brito**

Orientador: Doutor Miguel Nuno Pinheiro Quaresma



Vila Real, 2018



**Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro**

**Relação entre Tratamentos Metabólicos Pré e Pós-Parto nos Níveis de Cálcio, Magnésio e Incidência de algumas Doenças Puerperais em Vacas Leiteiras da Ilha Terceira e Barcelos**

**-Versão Final-**

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Sara Ermelinda Lemos Brito**

Orientador: Doutor Miguel Nuno Pinheiro Quaresma

Composição do Júri:

---

---

---

VILA REAL, 2018



# **DECLARAÇÃO**

**NOME:** Sara Ermelinda Lemos Brito

**C.C.:** 14385410

**CORREIO ELECTRÓNICO:** sarabrito19@gmail.com

**DESIGNAÇÃO DO MESTRADO:** Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA:**

Relação entre Tratamentos Metabólicos Pré e Pós-Parto nos Níveis de Cálcio, Magnésio e Incidência de algumas Doenças Puerperais em Vacas Leiteiras da Ilha Terceira e Barcelos.

**ORIENTADOR:** Doutor Miguel Nuno Pinheiro Quaresma

**ANO DE CONCLUSÃO:** 2018

Declaro que esta dissertação de mestrado é resultado da minha pesquisa e trabalho pessoal e das orientações do meu supervisor. O seu conteúdo é original e todas as fontes consultadas estão devidamente mencionadas no texto, e na bibliografia final. Declaro ainda que este trabalho não foi apresentado em nenhuma outra instituição para obtenção de qualquer grau académico.

Vila Real, 9 de outubro de 2018.

Sara Ermelinda Lemos Brito



'Tenho em mim todos os sonhos do mundo'

Fernando Pessoa



## AGRADECIMENTOS

À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, na pessoa do Magnífico Reitor, a todos os professores, técnicos, auxiliares e demais funcionários.

Ao Doutor Miguel Quaresma por ter aceite ser orientador deste trabalho, agradeço a sua paciência, prontidão e todos os seus conselhos.

Ao Professor Doutor Mário Silvestre, o meu obrigado pela ajuda com a análise estatística

À Dra. Ana Paula, que além de toda a confiança depositada em mim e de toda a paciência, investiu e acreditou em mim e nunca me deixou desistir. A si devo, não só, a realização deste trabalho. O meu muito obrigado por tudo.

Ao Dr. Mário Silveira e a toda a equipa de assistência médico-veterinária, ao Dr. João Fagundes, à Dra. Marlene Ribeiro, ao Dr. José Linhares, ao Dr. Pedro, à equipa do serviço de Inseminação da UNICOL e ao Fábio, o meu muito obrigado por me fazerem sentir em casa nesses 3 meses na ilha. Fica a vontade de voltar.

Um especial obrigado, ao Dr. Mário que me fez crescer e me viu crescer em tão pouco tempo.

O meu muito obrigado ao Sr. Zé Luís Parreira, ao Sr. João Gomes, ao Sr. Francisco Dinis, ao Sr. Marcelo Costa, ao Sr. Carlos Fagundes, ao Sr. Joaquim Sousa, ao Sr. Joaquim, ao Sr. Coutinho, ao Sr. Ezequiel, ao André e ao Sr. Brito por terem colaborado comigo neste projeto.

Ao Diogo Silva pela sua disponibilidade e boa disposição. À Bayer.

À Dra. Adelaide e a toda a equipa do laboratório da Segalab.

Ao João Agostinho, pelas gargalhadas, pelo companheirismo, por também acreditares em mim.

Às minhas meninas da Bilinha, às nossas lembranças e momentos partilhados, ao que fica e ficará.

À melhor turma de sempre, sem vocês o 24/7 não era a mesma coisa.

Ao grupo Tupperware.

À minha Inês de Sousa.

À minha irmã caçula, nunca te esqueças que consegues alcançar tudo aquilo a que te propões.

Ao meu avô, meu padrinho, o meu Sr. Lemos.

Ao André, obrigado por me fazeres querer ser o melhor de mim. 'Eu cuido de você, você cuida de mim'.

Aos meus pais. A vocês o meu maior e mais sincero obrigado, todo o vosso esforço não será esquecido e muito menos será em vão. O meu orgulho são vocês e o que juntos construíram.

## RESUMO

A hipocalcemia acarreta consigo repercussões diretas e indiretas na saúde e bem-estar dos animais com aptidão leiteira e na sua produtividade.

No presente trabalho realizou-se a quantificação dos níveis de cálcio e magnésio em 5 explorações da ilha Terceira e 6 explorações do concelho de Barcelos. Em cada exploração realizaram-se 10 colheitas (animais primíparos e múltiparos) nas primeiras 6 horas pós-parto para posterior determinação do valor sérico total de cálcio e magnésio. Foram igualmente recolhidos dados relativamente às doenças puerperais desenvolvidas nos 30 dias pós-parto.

Todas as explorações apresentaram hipocalcemia subclínica (HSC) mas não hipocalcemia clínica (HC). Os animais primíparos apresentaram 9% de incidência em HSC. Os animais múltiparos apresentaram 9% de incidência em HC, 51% em HSC e 40% em normocalcemia (NC). Relativamente aos valores de magnésio apenas se registou um caso de hipomagnesemia, em Barcelos. Na ilha Terceira verificou-se uma maior incidência de HSC (58% contra 23% observados em Barcelos), no entanto, em Barcelos verificou-se uma maior incidência de HC (7% contra 2% observados na ilha Terceira). Registaram-se 7 animais que apresentaram decúbito, dos quais 2 apresentavam valores de calcemia de HC e 5 de HSC.

Verificou-se que com o aumento da idade e do número de partos os animais apresentaram valores de calcemia mais baixos. No entanto, o mesmo não se verificou com a magnesemia. De um modo geral, os animais da ilha Terceira apresentam valores de magnésio superiores aos dos animais de Barcelos. Os fatores localização (Terceira/Barcelos) e exploração (A/B/C/D/E/F/G/H/I/J/K) não se mostraram como fatores influenciadores nos níveis de calcemia.

As doenças puerperais observadas foram retenção placentária, metrite (8 e 15 pós-parto), mastite (no dia do parto, 8 e 15 dias pós-parto) e cetose. Não se observaram prolapso uterinos nem deslocamentos de abomaso. Registou-se uma incidência de 17% (10/60) de retenção placentária, 12% (7/60) de metrite aos 8 dias pós-parto, 10% (6/60) de metrite aos 15 dias pós-parto, 3% (2/60) de mastite no dia do parto, 2% (2/60) de mastite aos 8 dias pós-parto e 7% (4/60) de cetose.

Os tratamentos metabólicos pré-parto não tiveram influência dos níveis de cálcio. Contudo, observou-se que os animais expostos à administração da vitamina D apresentaram, em média, valores de cálcio inferiores aos animais não expostos a este tratamento. Dos animais expostos a tratamento metabólico pós-parto verificou-se que apesar de serem animais considerados em risco, não desenvolveram doenças puerperais. Contudo, para se avaliar a influência destes tratamentos dever-se-ia ter realizado uma recolha após o tratamento para determinação dos níveis séricos de cálcio.

**Palavras chave:** Bovinos de aptidão leiteira, Hipocalcemia, Periparto, Doenças puerperais, Tratamento metabólico pré-parto, Tratamento metabólico pós-parto

## ABSTRACT

Hypocalcemia leads to direct and indirect repercussions on the health and well-being of animals through the practice of dairy and in their production.

In the present study the quantification of calcium and magnesium was performed in 5 farms of Terceira Island and 6 farms in Barcelos. In each farm, 10 collections (heifers and multiparous cows) were performed in the first 6 hours postpartum for subsequent determination of total serum calcium and magnesium. Data on puerperal pathologies within 30 days postpartum was also collected.

All farms presented subclinical hypocalcemia (HSC) but not clinical hypocalcemia (HC). Heifers presented 9% incidence in HSC. Multiparous cows had a 9% incidence in HC, 51% in HSC and 40% in normocalcemia (NC). Regarding the magnesium values, only one case of hypomagnesaemia occurred in Barcelos. In Terceira island there was a higher incidence of HSC (58% vs 23% observed in Barcelos), however, in Barcelos there was a higher incidence of HC (7% vs 2% observed in Terceira Island). There were 7 animals in decubitus, of which 2 presented calcium values of HC and 5 of HSC.

It was found that with increase in age and number of deliveries animals presented lower calcium values. However, the same was not observed with magnesemia. In general, animals in Terceira island presented higher magnesium values than animals in Barcelos. Location factor (Terceira/Barcelos) and farm (A/B/C/D/E/F/G/H/I/J/K) did not influence calcium levels.

Postpartum diseases were observed were retained placenta, metritis (8 and 15 days postpartum), mastitis (delivery day, 8 and 15 days postpartum), and ketosis. No uterine prolapses or abomasal displacements were observed. There was an incidence of 17% (10/60) retained placenta, 12% (7/60) metritis at 8 days postpartum, 10% (6/60) metritis at 15 days postpartum, 3% (2/60) of mastitis on the delivery day, 2% (2/60) of mastitis at 8 days postpartum and 7% (4/60) of ketosis.

Prepartum metabolic treatment had no influence on calcium levels. However, it was observed that animals exposed to the administration of vitamin D, has shown lower calcium levels compared to the others. The animals exposed to a postpartum metabolic treatment did not develop puerperal diseases, although considered at risk. However, to assess the influence of these treatments, a post-treatment recall should be performed to determine serum calcium levels.

**Keywords:** Dairy cattle, Hypocalcemia, Peripartum, Puerperal diseases, Pre-delivery metabolic treatment, Postpartum metabolism



## INDÍCE

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1.    | NOTA INTRODUTÓRIA   | 1  |
| 2.    | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA   | 4  |
| 2.1   | Metabolismo do Cálcio   | 4  |
| 2.2   | Regulação Hormonal do cálcio  | 4  |
| 2.3   | Paratiroide   | 4  |
| 2.4   | Paratormona (PTH)   | 4  |
| 2.4.1 | Efeito sobre o osso   | 5  |
| 2.4.2 | Efeito sobre o rim  | 6  |
| 2.4.3 | Efeito sobre o intestino  | 6  |
| 2.5   | Vitamina D ou Colecalciferol  | 6  |
| 2.5.1 | Efeito sobre o osso   | 7  |
| 2.5.2 | Efeito sobre o intestino  | 7  |
| 2.6   | Calcitonina   | 8  |
| 2.6.1 | Efeito sobre o osso   | 8  |
| 2.6.2 | Efeito sobre o rim  | 8  |
| 2.6.3 | Efeito sobre o sistema gastrointestinal                                 | 8  |
| 3.    | Hipocalcemia Clínica  | 9  |
| 3.1   | Patofisiologia  | 9  |
| 3.1.1 | Fatores predisponentes  | 10 |
| 3.1.2 | Fatores que afetam a homeostasia do Ca                                  | 11 |
| 3.2   | Sinais Clínicos   | 14 |
| 3.3   | Diagnóstico   | 15 |
| 3.4   | Tratamento  | 16 |
| 3.5   | Prevenção   | 17 |
| 3.5.1 | <i>Drench</i> oral de Ca no pós-parto imediato                          | 17 |
| 3.5.2 | Acidificação da Dieta (Diferença entre catiões e aniões da dieta, DCAD) | 18 |
| 3.5.3 | Diminuição da ingestão de Ca na dieta                                   | 20 |
| 3.5.4 | Administração vitamina D no pré-parto                                   | 21 |
| 3.6   | Métodos complementares de prevenção                                     | 22 |
| 3.6.1 | Controlo do magnésio na dieta no periparto                              | 22 |
| 3.7   | Condição corporal   | 23 |
| 3.8   | Duração período seco  | 24 |
| 3.9   | Consequências Clínicas da hipocalcemia                                  | 25 |
| 3.9.1 | Distocia  | 26 |
| 3.9.2 | Prolapso uterino  | 26 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.9.3 | Retenção placentária                     | 26 |
| 3.9.4 | Mastite                                  | 27 |
| 3.9.5 | Metrite e endometrite                    | 28 |
| 3.9.6 | Cetose                                   | 28 |
| 3.9.7 | Doenças aparelho digestivo               | 29 |
| 3.9.8 | Subfertilidade                           | 29 |
| 4.    | Objetivos do trabalho                    | 31 |
| 5.    | Material e Métodos                       | 33 |
| 5.1   | Caracterização das explorações           | 35 |
| a)    | Terceira                                 | 35 |
| b)    | Barcelos                                 | 36 |
| 5.2   | Tratamento estatístico dos dados         | 37 |
| 6.    | Resultados e Discussão                   | 39 |
| 6.1.  | Cronologia das recolhas                  | 39 |
| 6.2.  | Idade e paridade                         | 40 |
| 6.3.  | Calcemia                                 | 41 |
| 6.3.  | Magnesemia                               | 46 |
| 6.4.  | Doenças Puerperais                       | 48 |
| 6.5.  | Condição corporal                        | 51 |
| 6.6.  | Tratamentos profiláticos e metafiláticos | 52 |
| 7.    | Comentários Finais                       | 55 |
| 8.    | Referências bibliográficas               | 57 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Administração de Ca IV a animal em decúbito na Terceira .....  | 3  |
| <b>Figura 2:</b> Viatura de assistência veterinária da UNICOL .....   | 3  |
| <b>Figura 3:</b> Administração de <i>Drench</i> oral no pós-parto imediato, Barcelos 2017 .....   | 18 |
| <b>Figura 4:</b> Animal de condição corporal 3,25 tendo em conta a escala de 1 a 5. Ligamento sacral e ligamento de cauda visíveis, Barcelos 2018 ..... | 20 |
| <b>Figura 5:</b> Incidência das recolhas na Terceira ao longo dos meses .....   | 39 |
| <b>Figura 6:</b> Incidência das recolhas em Bachelos ao longo dos meses .....   | 39 |
| <b>Figura 7:</b> Distribuição das idades pelas diferentes faixas etárias.....   | 40 |
| <b>Figura 8:</b> Número de partos registados nos animais múltiparos ....  | 40 |
| <b>Figura 9:</b> Distribuição da amostra em animais primíparos e múltiparos.....  | 41 |
| <b>Figura 10:</b> Incidência da Hipocalcémia Subclínica nos animais primíparos analisados.....  | 41 |
| <b>Figura 11:</b> Incidência de Hipocalcemia Clínica, Hipocalcemia Subclínica e Normocalcemia nos animais múltiparos .....                              | 42 |
| <b>Figura 12:</b> Frequência relativa da HC, HSC e NC .....   | 43 |
| <b>Figura 13:</b> Incidência da HC, HSC e NC nas explorações terceirenses .....   | 43 |
| <b>Figura 14:</b> Incidência da HC, HSC e NC nas explorações barcelenses .....  | 44 |
| <b>Figura 15:</b> Níveis de Ca apresentados pelos animais em decúbito no dia do parto .....   | 45 |
| <b>Figura 16:</b> Incidência de decúbito .....  | 46 |
| <b>Figura 17:</b> Incidência de Hipomagnesemia .....  | 47 |
| <b>Figura 18:</b> Incidência de retenções placentárias em Barcelos .....  | 48 |
| <b>Figura 19:</b> Incidência de cetoses em Barcelos .....   | 49 |
| <b>Figura 20:</b> Animais que desenvolveram metrite aos 8 e 15 dias pós-parto .....   | 50 |
| <b>Figura 21:</b> Animais que desenvolveram mastite no dia do parto, nos 8 e 15 dias pós-parto.....   | 51 |
| <b>Figura 22:</b> Condição corporal dos animais observados .....  | 52 |
| <b>Figura 23:</b> Animais expostos a tratamento metabólico pré-parto .....  | 52 |
| <b>Figura 24:</b> Animais expostos a tratamento metabólico pós-parto .....  | 53 |



## ÍNDICE DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1:</b> Registo da casuística realizada no estágio com a Dra. Ana Paula em Barcelos .....  | 1  |
| <b>Tabela 2:</b> Registo da casuística realizada no estágio com a equipa de assistência veterinária da UNICOL na ilha Terceira .....        | 3  |
| <b>Tabela 3:</b> Ingestão de matéria seca, consumo de Mg e digestibilidade necessária do Mg para as exigências deste mineral no parto ..... | 23 |



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

**PTH** – Paratormona

**25-OHCC** – 25 hidroxicolecalciferol

**1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>** – 1,25 dihidroxicolecalciferol

**UV** – Raios ultravioleta

**25 HCC** – 25 hidroxicolecalciferol

**Ca** – Cálcio

**P** – Fósforo

**Na** – Sódio

**CL** – Cloro

**g** – grama

**Kg** – quilograma

**Na<sup>+</sup>** - ião sódio

**Ca<sup>2+</sup>** - ião cálcio

**K<sup>+</sup>** - ião potássio

**Mg<sup>2+</sup>** - ião magnésio

**SO<sub>4</sub><sup>-</sup>** - ião sulfato

**PO<sub>4</sub><sup>-</sup>** - ião fosfato

**H<sup>+</sup>** - ião hidrogénio

**Mg** – magnésio

**AMP cíclico** – 3', 5' monofosfatocíclico

**mmol** – milimole

**L**- litro

**mg** – miligrama

**dL** – decilitro

**ml** – mililitro

**nmol** – nanomole

**bpm** – batimentos por minuto

**IV** – via de administração intravenosa

**h** – horas

**SC** – via de administração subcutânea

**mEq** – miliequivalentes

**MS** – matéria seca

**DCAD** – diferença entre cátions e aniões na dieta

**ng** – nanograma

**d** – dia

**AGNE** – Ácidos gordos não esterificados

**HC** – Hipocalcemia Clínica

**HSC** – Hipocalcemia Subclínica

**NC** - Normocalcemia

## 1. NOTA INTRODUTÓRIA

O presente estágio curricular foi dividido em duas partes, uma primeira em Barcelos e uma segunda na ilha Terceira.

A primeira parte do estágio foi iniciado em agosto de 2017, em Barcelos, junto da Dra. Ana Paula e do Dr. João Agostinho. O serviço iniciava-se às nove horas da manhã. Às segundas, terças e sextas de manhã a Dra. Paula fazia o serviço de ADS/OPP na Cooperativa Agrícola de Barcelos C.R. L juntamente com o técnico auxiliar da cooperativa. As visitas às explorações eram previamente agendadas.

O mês de agosto coincidiu com o período de férias do técnico auxiliar, motivo pelo qual a campanha sanitária foi suspensa na segunda semana do mês, realizando-se então serviço de identificação de nado-mortos, de animais recém-nascidos e todo o serviço de escritório associado. Após o serviço do ADS/OPP, o trabalho iniciava-se com as chamadas efetuadas pelos produtores. Fazia-se uma seleção de modo a dar sempre a prioridade às urgências e dividia-se o trabalho entre a Dra. Paula e o Dr. João.

Os Médicos Veterinários, explicavam as metodologias utilizadas e incentivavam sempre a prática nas intervenções. A Dra. Paula ajudou também na seleção das explorações em Barcelos que colaboraram para este trabalho. As principais atividades realizadas estão descritas na seguinte tabela.

**Tabela 1:** Registo da casuística realizada no estágio com a Dra. Ana Paula em Barcelos

|  |                    |   |                              |                          |                                 |
|--|--------------------|---|------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| <b>Deslocamento abomaso à esquerda</b> | <b>Pneumonia</b>   | <b>Parto</b>                              | <b>Prolapso rectal</b>       | <b>Mastite</b>           | <b>Diagnósticos gestação</b>    |
| 10                                     | 4                  | 3   | 1                            | 13                       | 180                             |
| <b>Dilatação cecal (cirurgia)</b>      | <b>Cetose</b>      | <b>Diarreia Neonatal</b>                  | <b>Desordens locomotoras</b> | <b>Metrite</b>           | <b>Retenção placentária</b>     |
| 3                                      | 27                 | 19  | 7                            | 14                       | 21                              |
| <b>Necrópsias</b>                      | <b>Ruminotomia</b> | <b>Trepanação seios frontais (bovino)</b> | <b>Abate de Urgência</b>     | <b>Parésia Puerperal</b> | <b>Vacinação Desparasitação</b> |
| 11                                     | 1                  | 1   | 3                            | 2                        | 300                             |

A segunda parte do estágio iniciou-se a 1 de outubro e terminou a 22 de dezembro de 2017, na ilha Terceira, no arquipélago dos Açores, junto do Dr. Mário Silveira (Figura 1 e 2), Médico Veterinário que integrava a equipa de Assistência Veterinária da UNICOL (União das Cooperativas de Lacticínios Terceirense, UCRL). A equipa de Assistência Veterinária da

UNICOL era composta por 5 Médicos Veterinários assistentes, o Dr. João Fagundes, o Dr. Mário Silveira, a Dra. Marlene, o Dr. Pedro e o Dr. José Carlos.

Esta equipa trabalhava 365 dias por ano assegurando o serviço 24 horas por dia. Para tal, durante os dias úteis, existiam turnos diários que eram sempre assegurados por 2 Médicos Veterinários, o serviço noturno era assegurado por um Médico Veterinário. Os sábados e domingos de manhã eram assegurados por dois Médicos Veterinários e a tarde de domingo por um Médico Veterinário.

Durante o estágio, foi possível acompanhar o Médico Veterinário, Dr. Mário Silveira, nos seus turnos de segunda-feira de tarde, terça-feira de manhã, quinta-feira de tarde e sexta-feira de manhã. Os fins-de-semana eram alternados. Durante o estágio, houve igualmente a oportunidade de acompanhar os restantes Médicos Veterinários. Tal permitiu uma melhor integração, a observação de diferentes metodologias de trabalho e a amplificação da experiência de trabalhar em equipa.

Os produtores efetuavam a chamada para a receção da UNICOL e posteriormente esta era reencaminhada para o Médico Veterinário que estivesse mais perto do local. Os produtores não falavam diretamente com o Médico Veterinário ficando a parte logística à responsabilidade do Sr. Duarte Pimentel, que estava na receção das 9h até às 17h com pausa para o almoço das 12h às 13h, neste período em que a receção estava encerrada, as chamadas eram transferidas para a portaria e atendidas pelo guarda que estivesse ao serviço.

Cada Médico Veterinário da UNICOL tinha a seu cargo entre 3 a 5 explorações em que eram responsáveis por fazer o controlo reprodutivo, diagnósticos de gestação e a inserção dos dados no programa reprodutivo (Repro GTV®). Normalmente a regularidade das visitas era adequada ao tamanho do efetivo. Em explorações maiores (mais de 80 animais em lactação) faziam-se visitas quinzenais enquanto que em explorações mais pequenas estas eram mensais. As visitas eram feitas à segunda-feira de manhã, quinta-feira de manhã ou sábados de manhã quando não havia escalonamento para esse fim-de-semana.

O turno da manhã iniciava-se por volta das 5h, altura em que se começavam a receber as chamadas e terminava-se por volta das 13h. O turno da tarde iniciava-se às 13h e terminava por volta das 21h.

Para além do serviço de assistência veterinária, a UNICOL dispunha ainda de um serviço de inseminação artificial, de um serviço que permite a assistência às máquinas de ordenha e apoio à nutrição. Para além destes serviços, a UNICOL, tinha também uma vertente comercial que ia desde a produção de compostos para animais (através da sua fábrica de rações) até à venda de todos os fatores de produção necessários (ex. Fertilizantes). A recolha da totalidade do leite nas ilhas Terceira e Graciosa era também da responsabilidade da UNICOL.



**Figura 1** – Administração de Ca IV a animal em decúbito na Terceira



**Figura 2** – Viatura da assistência veterinária da UNICOL

As atividades principais realizadas com o Dr. Mário Silveira e a restante equipa de Médicos Veterinários assistentes estão descritas na seguinte tabela.

**Tabela 1:** Registo da casuística realizada no estágio com a equipa de assistência veterinária da UNICOL na ilha Terceira

|                                 |   |  |                              |                                  |                                   |
|---------------------------------|---|--|------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Parésia puerperal</b>        | <b>Deslocamento do abomaso à esquerda</b> | <b>Deslocamento do abomaso à direita</b> | <b>Pneumonia</b>             | <b>Parto</b>                     | <b>Prolapso Uterino</b>           |
| 12                              | 21  | 3  | 47                           | 8                                | 2                                 |
| <b>Colheita tronco cerebral</b> | <b>Mastite</b>                            | <b>Peritonite</b>                        | <b>Diagnósticos gestação</b> | <b>Carcinoma do olho</b>         | <b>Acidose Ruminal</b>            |
| 2                               | 12  | 2  | 174                          | 7                                | 6                                 |
| <b>Cetose</b>                   | <b>Diarreias neonatais</b>                | <b>Luxação coxofemoral</b>               | <b>Metrite</b>               | <b>Síndrome da veia cava</b>     | <b>Úlcera do Abomaso</b>          |
| 26                              | 8   | 3  | 5                            | 2                                | 3                                 |
| <b>Timpanismo</b>               | <b>Retenção placentária</b>               | <b>Feto mumificado</b>                   | <b>Abcesso</b>               | <b>Fotossensibilidade</b>        | <b>Prolapso rectal</b>            |
| 3                               | 10  | 2  | 7                            | 17                               | 2                                 |
| <b>Cesariana</b>                | <b>Endometrite</b>                        | <b>Hérnia umbilical</b>                  | <b>Fenda palatina</b>        | <b>Extirpação da 3ª pálpebra</b> | <b>Enucleação do globo ocular</b> |
| 1                               | 2   | 2  | 1                            | 9                                | 2                                 |

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Metabolismo do Cálcio**

O risco de desenvolvimento de doenças associado ao período de transição, correspondente às quatro semanas antes e quatro semanas depois do parto, é elevado (Shank *et al.*, 1981; Curtis *et al.*, 1985; Stevenson and Lean, 1998; DeGaris and Lean, 2009). A hipocalcemia constitui um fator de risco acrescido para que estas doenças ocorram (DeGaris and Lean, 2009).

A incidência da hipocalcemia clínica geralmente varia entre os 0 e 10%, mas pode chegar, e por vezes exceder, os 25%, regra geral à volta do momento do parto. Em alguns ensaios, a incidência da hipocalcemia clínica aproximou-se mesmo dos 80% no momento do parto (DeGaris and Lean, 2009).

### **2.2 Regulação Hormonal do cálcio**

O processo da homeorrexia do cálcio é regulado pela paratormona (produzida pela Paratiroide), pela forma ativa da vitamina D e, também, pela calcitonina (Newton and Nunamaker, 1985).

### **2.3 Paratiroide**

A paratiroide é o principal órgão envolvido no controlo metabólico do Ca e é composta por dois pares de glândulas que, nos ruminantes, estão localizadas na porção anterior e medial dos pólos dos dois lóbulos da glândula tiroide. A este órgão cabe a função da produção da paratormona (Cunningham, 1997; Garcia, 2012).

As células da paratiroide detetam a concentração de cálcio ionizado (biologicamente disponível) através de recetores moleculares sensíveis ao cálcio e que se localizam na superfície das células paratiroides. Quando a concentração do cálcio ionizado presente no fluído extracelular se encontra abaixo da concentração de cálcio necessária para manter todos estes recetores de cálcio ocupados, ocorre a secreção de PTH, que é libertada na corrente sanguínea (Goff, 2014).

### **2.4 Paratormona (PTH)**

A paratormona é um peptídeo, composto por 84 aminoácidos, que é sintetizado pelas células da paratiroide (Cunningham, 1997; Garcia, 2012; Goff, 2014). Esta é produzida sempre que há um declínio do Ca no sangue e permite regular a mobilização do Ca presente

nas reservas ósseas. Uma vez que também atua a nível dos túbulos renais, permite também um aumento, não muito significativo, da reabsorção do cálcio nos rins (Goff, 2008). Tal como os restantes mamíferos, a vaca passa assim por um estado de osteoporose de lactação, que resulta numa perda de 9-13% do cálcio presente nas reservas ósseas no primeiro mês de lactação (Ellenberger *et al.*, 1932; Goff, 2008).

Quando se verifica uma diminuição da concentração de Ca na corrente sanguínea, existe um aumento da taxa de secreção de PTH, enquanto a reação inversa acontece quando os níveis de Ca aumentam (Newton and Nunamaker, 1985; Garcia, 2012). Entre as várias funções da PTH encontram-se a de incrementar a concentração de cálcio e diminuir a de fosfato nos fluídos extracelulares, atuando diretamente ao nível do metabolismo ósseo e renal de Ca e de forma indireta no trato gastrointestinal, através da intervenção na ativação da vitamina D (Cunningham, 1997; Garcia, 2012). As células alvo primárias da PTH são os osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e as células epiteliais dos túbulos renais. Assim, a PTH tem efeito sobre o osso, sobre o rim e ainda, embora que de forma indireta, sobre o intestino (Goff, 2014).

#### **2.4.1 Efeito sobre o osso**

Quanto ao efeito que a PTH tem sobre o osso, há que considerar duas fases, uma fase rápida e uma fase lenta. A primeira, fase rápida, manifesta-se em poucos minutos e corresponde à fase em que a PTH atua sobre os osteócitos e osteoblastos, células que também têm como função absorver cálcio. Os osteócitos e osteoblastos formam entre si uma membrana designada por "Sistema de Membrana Osteocítica". Este sistema está presente em todo o osso e é ele que permite a separação do fluído extracelular e do fluído ósseo, no entanto, manifesta propriedades permeáveis, mantendo assim o equilíbrio entre ambos (Goff, 2014).

O Ca encontra-se em solução no fluído ósseo e é prontamente mobilizado e bombeado para o fluído extracelular pelos osteócitos em resposta ao aumento da concentração da PTH na corrente sanguínea (Guyton and Hall, 2000; Garcia, 2012; Goff, 2014). A quantidade de Ca no fluído ósseo é de cerca de 9 g quando a vaca se encontra num estado metabólico de alcalose e aumenta para cerca de 15 g de Ca quando a vaca está em estado acidótico (Goff, 2014).

A segunda fase requer algumas semanas para atingir um completo desenvolvimento e compreende a atuação sobre os osteoclastos, células cuja função não é apenas a de fomentar a absorção de cálcio e fosfato, mas também a de absorção do próprio osso (Guyton and Hall, 2000; Garcia, 2012; Goff, 2014). Pode-se assim considerar esta fase como sendo uma fase

lenta que acaba por ser na realidade dividida em duas fases. A primeira compreende a ativação dos osteoclastos já existentes (Guyton and Hall, 2000; Garcia, 2012). O cálcio existente no esqueleto ósseo encontra-se sob a forma de cristais ligados à matriz de colagénio. Esta forma disponível de Ca apenas pode ser mobilizada pelos osteoclastos, uma vez que estes produzem enzimas e ácidos capazes de digerirem a matriz de colagénio e assim libertar o Ca e o Fosfato que são depois mobilizados para a corrente sanguínea (Goff, 2014).

Os osteoclastos não possuem recetores para a PTH, no entanto, estes respondem aos fatores de citocinas libertados pelos osteoblastos em resposta à PTH. Estes fatores de citocinas induzem os osteoclastos preexistentes a reabsorverem o colagénio ósseo libertando assim o Ca e induzem também as células osteoprogenitoras a diferenciarem-se em novas células osteoclásticas (Goff, 2014). Esta última fase processa-se de forma mais prolongada. (Guyton and Hall, 2000; Garcia, 2012; Goff, 2014).

#### **2.4.2 Efeito sobre o rim**

A PTH, quando em elevadas concentrações no sangue, induz um aumento da reabsorção de Ca a nível dos túbulos distais que é acompanhado simultaneamente por uma redução da reabsorção de fosfato nos túbulos proximais (Guyton and Hall, 2000; Garcia, 2012). Além disso, a PTH exerce uma importante ação na ativação da vitamina D. É a intervenção da PTH sobre o rim que permite a conversão da 25-hidroxicoлекаlcefiferol (25-OHCC) na sua forma biologicamente ativa, o 1,25-dihidroxicoлекаlcefiferol ( $1,25 (OH)_2D_3$ ) (DeGaris and Lean, 2009).

#### **2.4.3 Efeito sobre o intestino**

O efeito exercido pela PTH, a nível do intestino, ocorre de forma indireta. A PTH é necessária para formação de 1,25-dihidroxicoлекаlcefiferol, este último responsável pela absorção intestinal do Ca proveniente da dieta. Assim sendo, quanto maior a concentração de PTH, maior a formação de 1,25-dihidroxicoлекаlcefiferol e conseqüentemente, ocorre o aumento da absorção intestinal do Ca da dieta (DeGaris and Lean, 2009; Goff, 2014).

### **2.5 Vitamina D ou Colecalciferol**

O colecalciferol, anteriormente considerado como sendo uma vitamina (Newton and Nunamaker, 1985) é atualmente considerado uma hormona, uma vez que atua em órgãos distantes daquele em que é produzido (Cunningham, 1997). O colecalciferol, que pode ser

sintetizado nas glândulas sebáceas da pele ou ser proveniente da dieta, é um precursor para a hormona  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Esta permite aumentar a eficiência da absorção intestinal do cálcio presente na dieta (Newton and Nunamaker, 1985; Goff, 2008).

Quando o colecalciferol é sintetizado na pele, com a intervenção dos raios ultravioletas (UV), forma-se a pré-vitamina  $\text{D}_3$  que é transportada na corrente sanguínea por intermédio de uma ligação com uma proteína (Newton and Nunamaker, 1985; Garcia, 2012). Assim que chega ao fígado, ocorre uma reação de hidroxilação, efetuada pela enzima calciferol-25-hidroxilase, passando a chamar-se 25-HCC (Banks, 1993; Garcia, 2012). Através da corrente sanguínea, o 25-HCC chega ao rim (Newton and Nunamaker, 1985; Garcia, 2012). Este último, se estimulado pela PTH, permite a conversão de 25-HCC em  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  pela ação da enzima  $1\alpha$ -hidroxilase (Goff, 2014).

A PTH intervém também na síntese de  $1,25(\text{HO})_2\text{D}_3$  uma vez que a conversão da vitamina D na sua forma ativa só ocorre quando os níveis de PTH estão aumentados (Cunningham, 1997; Goff, 2008; Garcia, 2012).

### **2.5.1 Efeito sobre o osso**

A vitamina D possui um importante papel na absorção, deposição e calcificação óssea. Os metabolitos da vitamina D tem um efeito hipercalcémico que é mediado pelo aumento da absorção intestinal e da reabsorção óssea. Devido a este efeito, existe um risco de toxicidade resultante de uma hipercalcemia constante e conseqüente calcificação dos tecidos (DeGaris and Lean, 2009).

### **2.5.2 Efeito sobre o intestino**

O principal alvo da vitamina D é o intestino, mais propriamente a mucosa do intestino delgado, a nível do duodeno e jejuno (Goff, 2014). É nesta porção do sistema digestivo que a  $1,25(\text{HO})_2\text{D}_3$  atua, promovendo o transporte transcelular ativo de Ca e P e estimulando a absorção destes (Newton and Nunamaker, 1985; Garcia, 2012; Goff, 2014). Este processo de absorção do Ca é dependente da vitamina D e é um processo que demora algum tempo a ser completamente ativado. São necessárias cerca de 48 horas desde do momento em que há um aumento da  $1,25(\text{HO})_2\text{D}_3$  no sangue até que este transporte transcelular ativo do Ca esteja implementado na sua plenitude (Goff, 2014).

## **2.6 Calcitonina**

A calcitonina, produzida pelas células parafoliculares da glândula tiroide (Mundy and Guise, 1999; Garcia, 2012), ao contrário da PTH, inibe a reabsorção óssea do Ca e aumenta a excreção urinária do Ca, de modo a diminuir os níveis da concentração sérica deste ião (Murray *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2016).

A concentração de calcitonina na corrente sanguínea aumenta quando estão presentes níveis de Ca superiores aos normais, ou seja, uma situação de hipercalcemia (Austin and Heath, 1981; Findlay and Sexton, 2004; Rodriguez *et al.*, 2016). Outros estudos com animais não ruminantes demonstraram que a calcitonina aumenta em resposta à ingestão, ou seja, esta hormona é libertada após uma rápida absorção pós-prandial de Ca impedindo assim o desenvolvimento de uma hipercalcemia (Roos *et al.*, 1980; Rodriguez *et al.*, 2016).

Esta hormona é assim uma hormona de emergência que atua de modo preventivo, quer para evitar situações de hipercalcemia, quer para evitar que ocorra uma perda excessiva de Ca a partir do esqueleto materno durante a gestação (Newton and Nunamaker, 1985; Garcia, 2012).

### **2.6.1 Efeito sobre o osso**

Uma vez que o efeito antagónico da calcitonina se manifesta, a ação da PTH é inibida e ocorre uma redução da passagem do Ca do osso para o fluído extracelular, o que por consequência diminui a reabsorção óssea. Assim, a calcitonina leva a que ocorra uma diminuição da taxa de ativação celular das células osteoprogenitoras, assim como provoca uma atrofia dos osteoclastos já existentes (Cunningham, 1997; Garcia, 2012). Tal leva a que haja uma inibição completa da reabsorção óssea, ainda que de forma transitória (Newton and Nunamaker, 1985; Garcia, 2012).

### **2.6.2 Efeito sobre o rim**

A nível renal, a calcitonina promove a excreção de fosfato ao diminuir a sua reabsorção no túbulo (Cunningham, 1997). Promove também a diurese de Na, Cl e do ião Ca (Newton and Nunamaker, 1985).

### **2.6.3 Efeito sobre o sistema gastrointestinal**

A calcitonina atua de uma forma direta e indireta na atividade gastrointestinal, inibindo a secreção de ácido gástrico e gastrina. Esta última é responsável por estimular a excreção de calcitonina (Cunningham, 1997; Garcia, 2012).

### **3. Hipocalcemia Clínica**

A hipocalcemia é uma doença metabólica que ocorre com uma elevada frequência na vaca leiteira e resulta de uma carência aguda em cálcio que se expressa por uma disfunção neuromuscular com paralisia flácida, colapso circulatório, depressão e coma (Oeztel and Goff, s.d; Anderson and Rings, 2009; Garcia, 2012). De todas as doenças de animais de produção, é a que mais predispõe à ocorrência de outras doenças no período de transição (Mulligan *et al.*, 2006; Garcia, 2012).

#### **3.1 Patofisiologia**

Durante o ciclo reprodutivo de uma vaca o seu metabolismo de cálcio sofre uma série de alterações. As alterações que ocorrem durante a lactação, sobretudo nas primeiras 24 horas, são as mais significativas (DeGaris and Lean, 2009). A perda diária de cálcio circulante durante a lactação pode exceder os 50 g. No que toca ao período antecedente ao parto, as perdas diárias de cálcio são da ordem dos 30 g (15 g em perdas na urina e fezes e 15 g para o crescimento fetal) (DeGaris and Lean, 2009).

No momento do parto, as exigências de cálcio, que são tanto maiores quanto maior a produção, aumentam devido à sua secreção para a formação do colostro que contém aproximadamente 2,3 g Ca/L (Rion, 2001; Garcia, 2012). Assim sendo, uma vaca que produza 10 litros de colostro perde em média 23 g de cálcio na primeira ordenha, o que corresponde a uma quantidade nove vezes superior à presente na reserva total do plasma (2,5-3 g) e duas vezes superior à que se encontra nas reservas extracelulares (9-11g) (Riond, 2001; Garcia, 2012).

Para compensar estas perdas, é necessário que haja um aumento da absorção de cálcio da dieta que se processa quer a nível ruminal quer a nível intestinal, associada a uma mobilização de cálcio presente nas reservas do tecido ósseo (Goff, 2008; DeGaris and Lean, 2009). Como o cálcio absorvido através da dieta é insuficiente para suprir as necessidades momentâneas, dado que é necessário um período de adaptação do intestino e osso, todas as vacas ficam assim sujeitas a algum grau de hipocalcemia no pós-parto imediato (Goff *et al.*, 1990; Rion, 2001; DeGaris and Lean, 2009). Os animais que não conseguem fazer este ajuste acabam por demonstrar sinais clínicos característicos de hipocalcemia clínica, vulgarmente conhecida como febre vitular ou febre do leite (Goff *et al.*, 1990).

### 3.1.1 Fatores predisponentes

#### 3.1.1.1 Idade

Com o aumento da idade aumenta o risco de hipocalcemia. Estima-se que este aumento seja de aproximadamente 9% por lactação (Lean *et al.*, 2006; DeGaris and Lean, 2008). Após a terceira lactação, inclusive, as vacas têm uma maior dificuldade em manter a homeostasia do Ca comparativamente às vacas com menor número de lactações. Assim, quanto maior a idade de um animal, maior a sua dificuldade em manter a homeostasia do Ca e maior a sua predisposição para o desenvolvimento de hipocalcemia (Goff, 2014).

Há medida que a idade vai avançando, para além de ocorrer uma redução do número de recetores de  $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$  no intestino delgado (Horst *et al.*, 1990; DeGaris and Lean, 2008; Goff, 2014), ocorre também uma redução do número de locais ativos de remodelação óssea, uma vez que o tamanho esquelético maduro já foi atingido até ao final da primeira lactação (Goff, 2014). Esta redução significa que há menos osteoclastos ativos e osteoblastos nas superfícies ósseas pelo que quando a PTH é secretada, em resposta à hipocalcemia, numa vaca mais velha haverá menos osteoblastos responsivos disponíveis a esta e como tal a imobilização óssea é mais lenta. Além disso, o tempo necessário para recrutar novos osteoclastos a partir das células osteoprogenitoras será maior. Numa novilha, os osteoclastos estão presentes e só precisam de ser ativados pela PTH pelo que a resposta é mais rápida (Goff, 2014).

#### 3.1.1.2 Raça

Os animais da raça *Jersey* e, em menor grau, das raças *Swedish Red*, *White Red* e *Norwegian Red* são conhecidos por terem uma maior incidência de hipocalcemia clínica comparando com animais da raça *Holstein-Frisian* (Goff, 2014).

Se se comparar o colostro e o leite de uma *Holstein* com uma *Jersey*, verifica-se que o teor em Ca é superior na *Jersey*, contudo, se se atender à alta produção da *Holstein* verifica-se que a relação Ca mobilizado por Kg de peso corporal é pouco maior na *Jersey* (Goff, 2014). Embora não existam dados que o comprovem indubitavelmente, uma vez que foi detetado uma grande variabilidade no ensaio, fala-se numa redução de 15% no número de recetores para a  $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$  no intestino em vacas da raça *Jersey* (Goff, 2014).

#### 3.1.1.3 Condição Corporal

Em vacas cuja condição corporal exceda os 3,5 (numa escala de 1-5) verifica-se um maior risco de desenvolvimento de hipocalcemia (Heuer *et al.*, 1999; DeGaris et Lean, 2008).

Alguns estudos indicam que vacas de leite com uma condição corporal superior são quatro vezes mais propensas ao desenvolvimento de uma hipocalcemia clínica (Ostergaard *et al.*, 2003; Mulligan *et al.*, 2006; Garcia, 2012).

Uma das estratégias para a prevenção da hipocalcemia clínica referidas por Mulligan *et al.*, (2006), incide no controlo da condição corporal não só no momento do parto, mas também no momento da secagem e ao longo do período de secagem. O principal objetivo é que, no momento do parto, a vaca seja classificada entre 3 e 3,5 e que a variação da sua condição corporal no período de secagem seja mínima (Mulligan *et al.*, 2006).

#### **3.1.1.4 Heritabilidade**

Segundo a literatura, a heritabilidade da hipocalcemia é baixa. Alguns estudos mais antigos referem a existência de heritabilidade na hipocalcemia. Payne, em 1997, chegou a referir que existia 12,8% de heritabilidade, no entanto, estudos mais recentes acabam por refutar estes valores (DeGaris & Lean, 2009).

#### **3.1.1.5 Dieta**

Nas vacas leiteiras, a repentina quebra de Ca sanguíneo é combatida através da redução da excreção urinária de Ca, do aumento da reabsorção óssea de cálcio do fluído ósseo e cristais ósseos, e por fim, da extração de Ca proveniente da dieta através do transporte passivo e do transporte dependente da vitamina D (Goff, 2014). Uma dieta que aporte mais catiões ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) que aniões ( $Cl^-$ ,  $SO_4^-$ ,  $PO_4^-$ ) predispõe a hipocalcemia (Goff, 2008).

### **3.1.2 Fatores que afetam a homeostasia do Ca**

#### **3.1.2.1 Alcalose metabólica**

A alcalose metabólica predispõe a hipocalcemia clínica e subclínica (Craigie and Stoll, 1947; Goff, 2008). Quando perante uma situação de alcalose metabólica, verifica-se que a resposta da PTH é bloqueada. Tal acontece porque a conformação do recetor da PTH é alterada durante a alcalose metabólica diminuindo a sensibilidade dos tecidos à PTH. Assim sendo, os ossos ficam impossibilitados de usar o Ca presente nos seus canalículos (Goff, 2008). Os rins falham na sua resposta à PTH, o que acaba por limitar a reabsorção renal de Ca por filtração glomerular. Além disso, a sua capacidade de converter a 25-hidroxivitamina D em  $1,25(OH)_2D_3$  fica comprometida (Goff, 2008). Tendo em conta tais situações, constata-

se que numa situação de alcalose metabólica a absorção do Ca proveniente da dieta fica impossibilitada (Goff, 2008).

A alcalose metabólica é o resultado de uma dieta que aporte mais cátions ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) que aniões ( $Cl^-$ ,  $SO_4^-$ ,  $PO_4^-$ ) na corrente sanguínea. Ocorre assim, um aumento dos níveis sanguíneos destes elementos positivos, originando uma disparidade das cargas elétricas no fluído corporal. Tal promove a entrada de uma quantidade de elementos de carga positiva superior à de elementos de carga negativa. Por forma a restaurar a electroneutralidade da corrente sanguínea, uma carga positiva, sob a forma de ião  $H^+$ , tem que ser 'retirada' do compartimento sanguíneo. Esta perda de concentração de iões  $H^+$  vai levar a um aumento do pH sanguíneo, levando conseqüentemente a uma alcalose metabólica (Goff, 2008).

Ao adicionar à dieta aniões que são rapidamente absorvíveis aumenta-se o total de cargas negativas na corrente sanguínea, permitindo uma maior concentração de  $H^+$  no sangue e, se há uma maior concentração de  $H^+$ , o pH do sangue diminui, tornando-o ácido e impedindo o estabelecimento de uma alcalose metabólica (Goff, 2008).

### 3.1.2.2 Hipomagnesemia

Durante o período de periparto, o magnésio (Mg) tem um efeito importante no metabolismo do cálcio. Perante uma situação de hipomagnesemia, ou seja, com níveis de Mg abaixo de 1,6 mg/dL está-se perante um fator de risco para o desenvolvimento de hipocalcemia clínica (Sansom *et al.*, 1983; Lean *et al.*, 2006; Neves *et al.*, 2017). Os baixos níveis de Mg na dieta das vacas em pré-parto estão associados a baixas taxas de mobilização do cálcio na altura do parto, o que acarreta consigo a possibilidade de hipocalcemia (van de Braak *et al.*, 1987; Neves *et al.*, 2017).

Em 2006, Lean *et al.*, mostraram que o aumento da suplementação em Mg tem uma grande influência entre as estratégias dietéticas para prevenção da hipocalcemia. Também nesse mesmo ano, Mulligan *et al.*, referiram que a concentração de Mg na dieta de vacas no pré-parto deve ser igual ou superior a 0,4% na matéria seca (MS).

A hipomagnesemia afeta o metabolismo do Ca de duas formas importantes, a primeira é através da redução da sensibilidade dos tecidos à PTH e a segunda é através da redução na secreção de PTH (Goff, 2014) e conseqüentemente a redução do metabolismo de 1,25 dihidroxivitamina D. Como tal, a hipomagnesemia, independentemente da alcalose metabólica, interfere com a capacidade da PTH interagir com as célula-alvo (Fatemi *et al.*, 1991; Neves *et al.*, 2017).

Quando a PTH se liga aos recetores no tecido ósseo ou renal, normalmente é iniciada a ativação da adenilciclase, resultando na produção de um segundo mensageiro, a adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMP cíclico). Quando há carência de Mg, a formação do AMP cíclico fica comprometida, resultando numa falha da ativação da célula e como tal, numa ausência dos mecanismos de reabsorção de Ca pelo tecido ósseo e numa carência da formação de 1,25 dihidroxivitamina D (Goff, 2014).

A manutenção dos níveis séricos em Mg é dependente do influxo constante de Mg disponível na dieta. O Mg, em animais jovens é absorvido no intestino delgado, porém em animais adultos, o rúmen e o retículo são os principais órgãos onde a absorção de Mg ocorre (Goff, 2008). De notar que a capacidade de absorção do Mg proveniente da dieta, diminui com o aumento da idade, aumentando assim o risco da hipomagnesemia à medida que os animais vão envelhecendo (van Mosel *et al.*, 1991; Goff, 2014).

A absorção de Mg, ao nível do rúmen, é dependente da concentração de Mg em solução no fluído ruminal e da integridade do mecanismo de transporte do Mg (Martens and Gabel, 1986; Goff, 2008). A concentração do fluído ruminal em Mg vai depender da disponibilidade deste na dieta fornecida aos animais. A experiência de campo, sugere que concentrações de Mg inferiores a 0,65 mmol/L (1.5mg/dL) em vacas no parto aumenta a suscetibilidade destas perante a hipocalcemia (van de Braak *et al.*, 1987; Goff, 2008). Atualmente, crê-se que concentrações séricas inferiores a 1.6mg/dL em animais em pré-parto irá aumentar a sua suscetibilidade à hipocalcemia (Goff, 2014).

A solubilidade do Mg diminui drasticamente à medida que o pH do rúmen sobe acima de 6,5. Em dietas ricas em forragens, tal pode ser um problema uma vez o pH pode interferir com a solubilidade do Mg (Goff, 2008). As forragens, para além de contribuírem para o aumento do pH ruminal, contém também ácidos trans-aconíticos cujos metabolitos interferem com a absorção do Mg a nível ruminal (Goff, 2008).

O transporte de Mg através da mucosa ruminal pode ser realizado através de um transporte ativo ou de um transporte passivo. O transporte ativo é afetado pelas altas concentrações de potássio (K), que quando presente despolariza a membrana apical do epitélio ruminal reduzindo o transporte de Mg. O transporte passivo, embora não seja afetado pela concentração de K, apenas ocorre quando a concentração de Mg no fluído ruminal é suficientemente alta para criar um gradiente favorável ao transporte (Goff, 2008).

### **3.1.2.3 Hiperfosfatemia**

O risco de desenvolvimento de hipocalcemia é tanto maior quanto maior for a disponibilidade em fósforo (P) na dieta fornecida a animais em pré-parto e o número de dias

que estes estão expostos à dieta (DeGaris and Lean, 2009). Dado que P é um anião poder-se-ia considerar o seu uso como forma de acidificar o sangue, contudo verificou-se que é mais provável que este cause hipocalcemia. Quando a concentração sanguínea em P atinge níveis acima de 6mg/100mL (1,9 nmol), o fosfato tem um efeito inibitório direto sobre a enzima renal 1 $\alpha$ -hidroxilase, evitando a formação de 1,25 (OH) $_2$ D $_3$ . Assim, mesmo que ocorra a secreção de PTH e mesmo que haja o reconhecimento desta pelos tecidos-alvo, a vaca será incapaz de produzir 1,25 (OH) $_2$ D $_3$ . Este é necessário para o transporte de Ca da dieta e a homeostasia de Ca fica assim comprometida (Goff, 2014).

Uma dieta que forneça mais de 80 g de P por dia aumenta o risco de desenvolvimento de hipocalcemia (Goff, 2014). Manter a dieta com níveis inferiores a 50 g por dia parece ser uma forma segura de garantirmos que o P não atinge níveis inibitórios sobre a enzima renal, contudo, só níveis abaixo dos 35 g por dia melhoram a homeostasia do Ca (Goff, 2014).

#### **3.1.2.4 Hipercalemia**

As dietas com elevados teores em K são por si só já um fator negativo indireto uma vez que o K interfere com a disponibilidade do Mg (Martin-Tereso & Martens, 2014). A ingestão de K tem uma influência alcalinizante sobre o estado ácido-base da vaca (Re'r *et al.*, 2009) e vários estudos demonstram que vacas em alcalose têm uma menor concentração sérica de Ca e uma maior incidência de hipocalcemia clínica (Goff et Horst, 1997; Rurosaki *et al.*, 2007; Kronqvist *et al.*, 2012).

### **3.2 Sinais Clínicos**

Em média 5 a 10% das vacas leiteiras acabam por sucumbir à hipocalcemia clínica, podendo a taxa de incidência em alguns efetivos chegar aos 34% (Houe *et al.*, 2001; Mulligan *et al.*, 2006). Em 2011, os resultados de um estudo realizado por Reinhardt *et al.*, em explorações dos Estados Unidos da América, apontam para um aumento da incidência da hipocalcemia subclínica à medida que a idade aumenta. Cerca de 25% das primíparas desenvolveram hipocalcemia subclínica enquanto que nos animais de 6<sup>a</sup> lactação apresentam uma incidência de 54%.

A hipocalcemia clínica ocorre geralmente desde as 24h até às 72h pós-parto (Divers and Peek, 2008), quando os níveis sanguíneos de Ca atingem valores inferiores a 5,5 mg/dL (ou seja, inferiores a 1,38 mmol/L) (Reinhardt *et al.*, 2011; Goff, 2014). A hipocalcemia subclínica ocorre quando os níveis sanguíneos de Ca atingem valores compreendidos entre

os 5,5 mg/dL e os 8 mg/dL (entre 1.38 e 2.0 mmol/L), podendo já ser visíveis alguns sinais clínicos (Reinhardt *et al.*, 2011; Goff, 2014).

Os sinais clínicos da hipocalcemia podem ser categorizados em 3 estados (Ishler *et al.*, 2010):

- 1º estado: este tem uma duração muito curta (<1 hora) e como tal raramente é identificado. A vaca pode apresentar perda de apetite, sinais de excitabilidade, nervosismo, fraqueza e hipersensibilidade (Ishler *et al.*, 2010).
- 2º estado: esta fase tem uma duração de 1 a 12 horas. O animal apresenta-se deprimido, em decúbito esternal (causado pela flacidez muscular), com a cabeça apoiada sobre o flanco. A vaca pode também apresentar-se apática, com as orelhas caídas e frias, assim como a base dos cornos, o focinho seco e podem observar-se ligeiras fasciculações (Ishler *et al.*, 2010).
- 3º estado: este estado é caracterizado por uma progressiva perda da consciência do animal, podendo chegar a um estado comatoso, apresentando-se este em decúbito lateral, incapaz de se manter em estação. Quando num estado mais avançado, os animais apresentam sinais de timpanismo grave, devido ao decúbito conjugado com a atonia ruminal. O débito cardíaco está muito comprometido, os sons cardíacos podem ser difíceis de escutar ou chegarem a ser inaudíveis, e o ritmo cardíaco aumentado, atingindo os 120 batimentos por minuto (bpm) (Ishler *et al.*, 2010).

### 3.3 Diagnóstico

Para se proceder ao diagnóstico de hipocalcemia começa-se por fazer uma anamnese o mais completa possível por forma a obter o máximo de informação. Os parâmetros como o número de lactações, a alimentação fornecida no período seco e o tipo de parto acabam por ser linhas condutoras na construção da história pregressa. A observação dos sinais clínicos que o animal apresenta juntamente com a história pregressa, ajuda a definir os diagnósticos diferenciais. O recurso a exames complementares, como o hemograma e a medição dos níveis séricos de Ca permitem também a confirmação do diagnóstico de hipocalcemia. No entanto, na prática de campo, este recurso acaba por ser difícil, dado que o resultado não é obtido no momento (Radostitis *et al.*, 2007; Garcia, 2012) .

O diagnóstico da hipocalcemia é baseado na ocorrência de paresia do animal momentos após o parto, no entanto, deve-se ter presente que existem diversas doenças para além da hipocalcemia que provocam o decúbito de uma vaca assim o diagnóstico apoia-se essencialmente na resposta positiva ao tratamento direcionado para hipocalcemia (Radostitis *et al.*, 2007).

### 3.4 Tratamento

O tratamento da hipocalcemia deve ser feito o mais brevemente possível, especialmente se se verificar o decúbito do animal. A pressão exercida pelo peso da vaca pode levar à isquemia dos músculos e nervos, que perpetuada no tempo pode levar a uma situação mais grave, à necrose desses tecidos (Goff, 2008). Assim, quanto maior for o intervalo de tempo entre a queda do animal e o tratamento, maior será o número de casos de síndrome de vaca caída (Goff, 2008).

A forma mais rápida e atempada para restaurar a concentração normal do Ca no plasma é a administração de sais de Ca por via intravenosa (IV), sendo vulgarmente o borogluconato de Ca. Este formato de Ca permite uma rápida recuperação do tônus do músculo-esquelético e da função do músculo liso do trato gastrointestinal (Divers & Peek, 2008). Em geral, as preparações comerciais, administradas IV, têm concentrações entre os 8,5 e os 11,5 g de Ca/500mL. Estas podem também conter fontes de Mg, P e glicose (sob a forma de dextrose) (Goff, 2008).

A dose mais eficaz IV é de cerca de 2 g de Ca /100 kg de peso corporal (Goff, 2008), ou seja, numa vaca de 600kg, será necessário administrar 12 g de Ca IV. Uma boa regra a ter em mente é administrar o Ca a uma taxa de 1 g / min, ou seja, numa vaca de 600 kg deve-se administrar o Ca em 12 minutos. Se administrada muito rapidamente, corre-se o risco de induzir uma arritmia cardíaca fatal (Goff, 2008). Assim deve-se ir monitorizando a frequência cardíaca enquanto se administra o Ca. Caso se detete uma bradicardia ou uma taquicardia, deve-se diminuir a velocidade de administração, ou mesmo interromper, até voltar a ter um ritmo cardíaco normal e constante. Os tratamentos de Ca intravenosos elevam o Ca sérico, mantendo o seu nível acima do normal por cerca de 4 h (Goff, 2008).

Os sais de cálcio também podem ser injetados por via subcutânea (SC). Apesar desta via de administração ser mais segura quando comparada com a via IV, a absorção é variável, variando consoante o grau de comprometimento do fluxo sanguíneo na circulação periférica, e como tal não é tão eficiente, podendo mesmo não ser tão eficaz. A quantidade de Ca que pode ser injetado, via subcutânea, num único ponto deve ser limitado a 1-1,5 g Ca (cerca de 50-75 mL da maioria das preparações comerciais) (Goff, 2008).

As preparações de Ca para administração intramuscular também estão disponíveis no mercado (como sendo o levulato de Ca ou lactato de Ca). A maioria dessas preparações deve ser limitado a 0,5-1,0 g de Ca em cada local de injeção por forma a evitar a necrose dos tecidos. Para obter uma dose eficaz de Ca num animal clinicamente hipocalcémico serão necessárias entre 6 a 10 injeções em pontos suficientemente separados. Tal pode ter um impacto negativo na qualidade da carne no local da injeção e, portanto, esta via de administração vem caindo em desuso (Goff, 2008).

A administração de Ca via oral, sob a forma de gel, pasta, líquido ou bolos, é também uma via de administração utilizada pelos produtores uma vez que é mais simples e fácil de executar. A vaca tem alguma dificuldade em utilizar o transporte ativo de Ca através das células intestinais, motivo pelo qual, uma administração de quantidades solúveis elevadas de Ca oral promove a difusão passiva de Ca, maximizando a absorção. Contudo, os tratamentos orais de Ca não são recomendados como tratamento para casos clínicos, uma vez que a eficácia e rapidez da absorção assim como o tempo que demora a restabelecer os níveis de Ca podem ser insuficientes, além de que se se está perante um animal com perda de consciência não se deve optar pela via oral como forma de administração devido ao risco de falso trajeto (Goff, 2008).

### **3.5 Prevenção**

#### **3.5.1 *Drench* oral de Ca no pós-parto imediato**

A aplicação de *Drench* oral de cálcio é uma estratégia que alguns produtores utilizam, como se pode observar na figura 3, embora não se possa considerar esta estratégia como sendo preventiva uma vez que se está a fornecer Ca à vaca no pós-parto. A administração de Ca por via intravenosa é necessária em vacas que apresentem sinais clínicos de hipocalcemia clínica de modo a prevenir ou tratar o decúbito (Oetzel, 2013). Os suplementos orais, na forma de bólus, *drench*, pasta ou gel, parecem ser os mais apropriados para casos em que se suspeita de hipocalcemia subclínica e têm demonstrado fornecer um aporte mais moderado, mas que aumenta consideravelmente a concentração sérica de Ca (Blanc *et al.*, 2014; Leno *et al.*, 2017).

A suplementação oral é baseada na baixa capacidade de a vaca utilizar o transporte ativo de Ca através da mucosa intestinal. Deve-se ter presente que o transporte de Ca do lúmen intestinal para o fluído extracelular, através das células epiteliais, pode processar-se de duas formas, ativa ou passiva. A forma passiva processa-se unicamente pelo gradiente de concentrações e é esta forma de transporte que se aproveita. Assim sendo, quando a concentração de Ca ionizado presente nas junções entre as células epiteliais excede significativamente a concentração de Ca ionizado existente no fluído extracelular (1.25 mM), o Ca flui através das junções diretamente para o fluído extracelular e para o sangue (Goff, 2014).

Ao fornecer ao animal grandes quantidades de Ca solúvel, é possível tirar proveito do transporte passivo pela mucosa intestinal uma vez que o gradiente será favorável no sentido da absorção de Ca. Os melhores resultados são obtidos com doses de Ca entre os 50 a 90 g de Ca por dose (Goff, 2014). As soluções aquosas de cloreto de cálcio podem causar lesões

epiteliais (Martin-Tereso & Martens, 2014) assim pode-se usar o propionato de cálcio que é também a vantagem de ser um precursor gliconeogénico (Goff, 2014).

Recentemente, Leno *et al.* (2018), realizaram um estudo em que um dos objetivos era perceber o efeito da administração de uma dose oral única de Ca nas primeiras 24 horas pós-parto na concentração plasmática de Ca. Infelizmente



constataram que a administração de uma dose única, fornecendo entre 54 – 64g de Ca, não resultou num aumento observável nas primeiras 24 horas pós parto. Contudo, verificaram que tanto o desempenho como a saúde animal em vacas consideradas de risco e vacas pluríparas responderam positivamente à administração do bólus (Leno *et al.*, 2018).

O benefício de recorrer a *drenchs* orais juntamente com uma dieta DCAD adequadamente formulada torna-se cada vez mais uma realidade, estudos recentes cada vez mais associam a baixa incidência de hipocalcemia com o aumento do desempenho e saúde animal (Goff, 2014).

**Figura 3** – Administração de Drench oral no pós-parto imediato. Barcelos, 2017

### 3.5.2 Acidificação da Dieta (Diferença entre catiões e aniões da dieta, DCAD)

A maioria das dietas pré-parto baseadas em forragens é rica em catiões como o sódio e, particularmente, o potássio. Assim, a prevenção da hipocalcemia está amplamente focada na restrição alimentar dos catiões Na e K, e com a adição ou não de aniões (Neves *et al.*, 2017). Estas dietas ricas em forragens podem levar à alcalose metabólica e promover hipocalcemia, dado que a produção renal de  $1,25 (OH)_2D_3$  e a reabsorção óssea estão diminuídas (Goff *et al.*, 2008). Assim sendo, a indução de um estado metabólico de acidose, através da suplementação de sais aniônicos, criando um balanço metabólico negativo de Ca, previne a hipocalcemia no parto (Goff *et Horst*, 1998; Goff, 2008; Martinez *et al.*, 2017).

Uma das estratégias nutricionais mais comuns utilizada como método de prevenção da hipocalcemia é a indução de uma acidose metabólica moderada, através de uma modificação da dieta no que respeita à diferença entre os iões positivos (catiões) e os iões negativos (aniões) (Martin-Tereso & Martens, 2014). A acidose metabólica previne a hipocalcemia uma vez que a expressão dos recetores da PTH é melhorada, resultando num aumento da atividade da PTH e consequentemente num aumento da concentração sérica em  $1,25 (OH)_2 D_3$  (Rodriguez *et al.*, 2016).

A DCAD descreve o equilíbrio entre os cátions e aniões presentes na dieta de vacas leiteiras (Macky, 2007; Garcia, 2012). A diferença entre o número de partículas de cátions e aniões absorvidos da dieta irá determinar o pH sanguíneo (Goff, 2008).

O pH urinário é um importante indicador que dá informação sobre estado acidótico sistêmico (Wu *et al.*, 2014), motivo pelo qual deve ser monitorizado de modo a aferir a eficácia da dieta. Quando é fornecida uma dieta DCAD negativa, este terá valores compreendidos entre 6,2 e 6,8 (para as vacas *Holstein-Frisian*) e 5,8 e 6,3 (para vacas *Jersey*) de modo a um controlo efetivo sobre a hipocalcemia (Goff, 2008). Se o valor de pH urinário estiver entre os 5 e 5,5 ou inferior, deve-se que alterar a dieta dado que se está a promover um aporte excessivo em aniões e corre-se o risco de promover um estado acidótico descompensado (Goff, 2014).

A DCAD expressa-se em miliequivalentes por quilograma de matéria seca (mEq/Kg MS), mas a sua descrição através de uma equação exata ainda hoje é incerta. Em 2008, Goff *et al.*, tendo em conta os efeitos acidificantes dos vários sais aniônicos, sugeriram a seguinte equação  $DCAD = (Na^+ + K^+) - (Cl + 0,6 S^{2-})$ . De notar que estes iões não são os únicos a influenciar o pH sanguíneo, sendo que o Ca, Mg e P presentes na dieta possuem também um papel importante (Goff, 2008).

A alimentação com dietas DCAD negativas nos últimos 21 dias de gestação, promove a absorção e mobilização do Ca, prevenindo a hipocalcemia e mantendo a ingestão de MS, melhorando a produção de leite no pós-parto (Wu *et al.*, 2014) e conseqüentemente toda a lactação. Esta estratégia tem-se demonstrado eficaz no que toca à prevenção da hipocalcemia (Chan *et al.*, 2006; DeGroot *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2014). Lean *et al.*, (2006), referiram que uma ração com uma DCAD diária de -170 mEq/Kg de MS leva a uma diminuição, ou mesmo erradicação, do risco de hipocalcemia.

Recentemente, Martinez *et al.*, (2017), realizaram um ensaio em que demonstraram que uma dieta DCAD negativa tende a melhorar a intensidade da atividade oxidativa dos neutrófilos e a aumentar a intensidade fagocítica e a proporção de neutrófilos em vacas em pré-parto. A adição de calcidiol (25-hidroxivitamina D) também melhora a proporção de neutrófilos com atividade oxidativa, reduzindo a incidência de retenção placentária e de metrite, reduzindo assim a proporção de vacas com múltiplas doenças no início da lactação. Com este estudo, os autores concluíram que a combinação de uma dieta DCAD negativa e a administração de calcidiol reduz a morbilidade em pelo menos 60%. De ressaltar que vacas doentes têm menores concentrações de Ca ionizado no sangue assim como uma menor concentração sérica total de Ca comparativamente às vacas saudáveis (Martinez *et al.*, 2017). Os mesmos autores registaram ainda que manipulando uma dieta DCAD com calcidiol, este

tende a aumentar a taxa de prenhez em 55%, o que reduz, em 19 dias, a média dos dias em aberto.

Tendo em conta os resultados de Martinez *et al.*, 2017, poderá ser interessante uma abordagem à utilização de uma DCAD negativa combinada com 3mg de calcidiol diários, como mais uma estratégia de prevenção da hipocalcemia.

### **3.5.3 Diminuição da ingestão de Ca na dieta**

Desde cedo, a dieta da vaca seca é um ponto importante e muito discutido quando se fala em hipocalcemia. Inicialmente, pensava-se que o excesso de Ca na dieta era a principal causa de hipocalcemia pós-parto (Goings *et al.*, 1974; Oba *et al.*, 2011). Quando alimentadas com dietas em que se restringe a quantidade de Ca a níveis inferiores ao necessário, cria-se um balanço negativo de Ca (Goff, 2008). Como tal, ocorrerá a secreção de PTH em resposta à diminuição da concentração sérica de Ca. Esta por sua vez irá estimular a reabsorção óssea de Ca e a produção de 1,25- dihidroxivitamina D (Goff, 2006). Esta estimulação aumenta o efluxo diário de Ca no osso e prepara o intestino para absorver Ca de forma eficaz através do transporte transcelular de Ca na dieta (Goff, 2014).

Nestas dietas em que se faz a restrição do Ca, o ideal seria trabalhar com níveis de Ca disponível abaixo dos 20 g. Algumas explorações dos Estados Unidos da América formularam dietas com níveis inferiores aos 50 g e constatou-se que não foi o suficiente para estimular a secreção de PTH (Goff, 2014). Os níveis de Ca absorvível requerido por uma vaca na fase final da gestação são de 14 g por dia em vacas *Jersey* e cerca de 22 g por dia em vacas *Holsteins*. Para que uma dieta seja capaz de estimular a secreção de PTH, esta tem que ter níveis de Ca absorvível abaixo dos níveis requeridos. Assim sendo, uma vaca Holstein de 600 Kg, que consuma 13 Kg de matéria seca (MS) deve ser alimentada com uma dieta cujos níveis de Ca absorvível seja inferior a 0,15%, de modo a serem fornecidos menos de 20 g de Ca por dia (Goff, 2014).

De um modo geral, os alimentos concentrados são pobres em Ca. As forragens, por sua vez, são ricas em Ca, contudo não há regra sem exceção. A silagem de milho e a palha, por exemplo, têm teores em Ca relativamente baixos (Martin-Tereso & Martens, 2014). Na prática é viável e benéfico reduzir a ingestão de Ca evitando forragens verdes (como as gramíneas e luzerna) nas dietas de pré-parto (Martin-Tereso & Martens, 2014).

Para reduzir o suprimento de Ca, foi proposta a incorporação de partículas de silicatos (zeólito) no alimento. Este atua como antagonista, reduzindo a disponibilidade de Ca (Martin-Tereso & Martens, 2014) uma vez que se liga ao Ca e faz com que este seja expelido nas fezes sem ser absorvido (Goff, 2014). A desvantagem aparente da sua utilização é o efeito

que este tem sobre o consumo, uma vez que era necessária uma dose elevada (1 Kg) para surtir o efeito desejado. De modo a colmatar esta falha, existe uma fórmula de zeólito melhorada e quimicamente alterada que permitiu um aumento da sua afinidade e especificidade (Goff, 2014). Assim, em doses moderadas (23 g/Kg de MS), a supressão da ingestão é controlada sem que haja comprometimento da eficácia do seu uso (Martin-Tereso & Martens, 2014). A alimentação zeolítica previne a hipocalcemia na medida que reduz a disponibilidade do Ca antes do parto, no entanto tem mostrado efeitos negativos sobre a magnesemia e a fosfatemia que pode estar associado ao modo de ação dos zeólitos (Martin-Tereso & Martens, 2014).

É importante ter presente que quando há uma exposição prolongada a níveis altos de PTH (induzidos por dietas restritas em Ca prolongadas) ocorre uma diminuição da sensibilidade dos tecidos alvo da hormona (Goff, 2008) e como tal toda esta estratégia dietética cai por terra e acaba-se por ter como consequência o inverso do desejado. De notar também, que após o parto, a dieta fornecida à vaca deve ser rica em Ca de modo a garantir o suprimento das necessidades neste mineral e o sucesso desta estratégia dietética (Goff, 2014).

#### **3.5.4 Administração vitamina D no pré-parto**

A administração de vitamina D, nas suas variadas formas, tem sido estudada como forma de prevenir a hipocalcemia (Martin-Tereso & Martens, 2014). Goff, em 2014, sugeriu que a suplementação de vitamina D em vacas secas é uma prática razoável, sendo que os níveis desta suplementação devem estar compreendidos entre as 20.000 e as 35.000 unidades internacionais (UI). Tal permite um aumento das concentrações séricas de 25 OHCC para níveis de 30-50 ng/mL fornecendo substrato adequado para a síntese de  $1,25 (OH)_2D_3$  que aumentará a absorção intestinal do Ca dietético (Goff, 2014).

Infelizmente, a dose de vitamina D que efetivamente previne o desenvolvimento de hipocalcemia é muito próxima da dose tóxica (Goff, 2014). Como a vitamina D exógena é independente da regulação da PTH (Martin-Tereso & Martens, 2014) esta pode levar a uma calcificação metastática irreversível dos tecidos moles (Goff, 2014).

Se, por outro lado, forem administradas doses mais altas (500.000 a 1 milhão de unidades de vitamina D) pode-se estar a induzir hipocalcemia porque os altos níveis de  $1,25 (OH)_2 D$  resultante do tratamento, suprimem a secreção de PTH e suprimem diretamente a síntese renal endógena de  $1,25 (OH)_2 D$  (Goff, 2014). Quando a fonte exógena de vitamina D cessa a sua ação, os animais tornam-se hipocalcémicos uma vez que o organismo deixa de conseguir manter a absorção intestinal de Ca (Martin-Tereso & Martens, 2014). Em alguns

casos, este mecanismo impede o desenvolvimento da hipocalcemia no momento do parto ou nos primeiros dias pós-parto, contudo explica a hipocalcemia tardia, que pode ocorrer 7 a 12 dias após o parto (Goff, 2014).

Assim, o tratamento com 1,25 hidroxivitamina D e dos seus análogos pode ser mais eficaz e muito mais seguro do que usar vitamina D (Goff, 2014). No entanto, há que ter em mente que as vacas só beneficiarão da sua administração quando esta ocorrer no momento certo em relação ao parto (Martin-Tereso & Martens, 2014) e que o problema da supressão da produção renal de 1,25 hidroxivitamina D pode ser minimizado se for realizada uma retirada lenta da hormona exógena (Goff, 2014).

Em 2008, Zadnik *et al.*, realizaram um estudo em 47 animais, dos quais 24 eram controlo. No grupo de 23 animais, grupo experimental, foi administrado por via intramuscular, 10 ml de vitamina D<sub>3</sub> (Duphafral® VIT.D<sub>3</sub> 1000) sete dias antes do parto. Sete dias após o parto, das 24 vacas do grupo de controlo, 9 exibiram sinais clínicos de hipocalcemia clínica e 8 apresentaram retenção placentária. Do grupo experimental apenas 3 exibiram hipocalcemia clínica. Estes resultados apontam para a eficácia da administração de colecalciferol na prevenção da hipocalcemia clínica e nas doenças a ela associadas.

### **3.6 Métodos complementares de prevenção**

Está descrito na literatura que a ocorrência da hipocalcemia, quer clínica quer subclínica, aumenta a taxa de incidência de outras doenças características do período de transição (Mulligan *et al.*, 2006).

#### **3.6.1 Controlo do magnésio na dieta no periparto**

A hipomagnesemia tem efeitos negativos na produção da PTH e na capacidade de resposta dos seus tecidos alvo, como tal, há uma redução da capacidade de mobilização óssea e dietética do Ca, ficando o animal num risco acrescido de desenvolver hipocalcemia. (Martin-Tereso & Martens, 2014). Ainda, Martin-Tereso and Martens, em 2014, referiram que uma alteração na dieta do valor de Mg, de 0,3% para 0,4% (na MS), representava uma redução do risco de hipocalcemia clínica de 62%. Tal pode ser facilmente explicado pelo cálculo do consumo de Mg e exigência necessária que inclui Mg para a manutenção e colostro. Assim sendo, considerando o volume de colostro produzido de 5L, e a concentração do mesmo de 0.733mg/Kg, dá um total de 3,6g/d.. Considerando a exigência de manutenção de 2,8g/d e somando a exigência de 3,6g/d para a produção de colostro dá-nos um total de 6,4g/d de exigência em Mg.

A ingestão de MS é significativamente reduzida nos momentos que antecedem o parto, variando entre 6-10 Kg/d. Esta diminuição de ingestão é acompanhada por um consumo de Mg de 24 a 40 g/d, quando o valor de Mg na dieta é de 0,4% na MS. Devido à baixa digestibilidade do Mg, a digestibilidade calculada do Mg para cobrir as necessidades requeridas (6,4 g/d) mostra que o consumo de Mg de 6-8 Kg/d de ingestão de MS é baixo, mesmo em altas concentrações de Mg (0,4% MS) (Martin-Tereso & Martens, 2014).

**Tabela 2:** Ingestão de matéria seca, consumo de Mg e digestibilidade necessária do Mg para as exigências deste mineral no parto (adaptado de Marti-Tereso & Martens, 2014). \*Nível elevado de digestibilidade para o nível necessário em Mg

| Ingestão de MS (IMS) (Kg/d) | Mg (% IMS) | Ingestão de Mg (g/d) | Mg necessário (g/d) | Digestibilidade necessária em Mg (%) |
|-----------------------------|------------|----------------------|---------------------|--------------------------------------|
| 6                           | 0.4        | 24                   | 6.4                 | 27*                                  |
| 8                           | 0.4        | 32                   | 6.4                 | 20                                   |
| 10                          | 0.4        | 40                   | 6.4                 | 16                                   |

Deve-se ter também presente que existem outros fatores que afetam o transporte ativo do Mg ao longo da mucosa ruminal, como sendo a concentração de Na e K. Em dietas baixas em Na a suplementação com Na pode ajudar a melhorar o transporte de Mg. Contudo, em altas concentrações pode levar à excreção urinária de Mg. Outra solução é a administração de ionóforos (como por exemplo a monensina) que podem aumentar a eficiência de absorção de Mg em 10%. Em dietas ricas em K, os efeitos negativos não podem ser solucionados com a adição extra de Na. As pastagens com níveis altos de humidade podem também reduzir a quantidade absorvida na medida em que aumenta a taxa de passagem do Mg do rúmen (Goff, 2014).

Embora o Mg não esteja diretamente relacionado com a etiologia da hipocalcemia clínica, é importante avaliar a situação do efetivo relativamente a este mineral (Thilising-Hansen *et al.*, 2002; Garcia, 2012).

### 3.7 Condição corporal

A avaliação da condição corporal de uma vaca leiteira assume uma elevada importância uma vez que permite avaliar a proporção de gordura corporal que a vaca apresenta. A condição corporal é ainda um fator importante para a avaliação do manejo de

uma exploração (Roche *et al.*, 2009). A condição corporal pode ser avaliada numa escala que vai de 1 (muito magra ou esquelética) a 5 (muito gorda) (Houe *et al.*, 2001).

As vacas secas cuja condição corporal seja excessiva são animais propensos a desenvolverem cetose e fígado gordo, o que pode conduzir à supressão direta ou indireta da imunidade do animal, através de um balanço energético negativo continuado (Mulligan *et al.*, 2008). É importante realçar que vacas consideradas gordas têm também uma maior probabilidade de sofrerem de hipocalcemia, exacerbando a imunossupressão das mesmas, causando distocias e retenção placentária (Houe *et al.*, 2001).

As vacas gordas, no momento do parto, têm quatro vezes mais probabilidade de desenvolverem febre vitular (Mulligan *et al.*, 2006). Existem várias hipóteses que tentam justificar essa observação. Algumas assentam no facto de que uma vaca com uma condição corporal excessiva tem uma excreção de Ca elevada e contrariamente, uma absorção reduzida, predispondo assim ao desenvolvimento da doença (Roche *et al.*, 2009; Garcia,



2012). Mulligan *et al.*, em 2008, atenta no facto de que uma vaca gorda tem uma menor capacidade de ingestão fazendo com que o aporte em Ca e Mg dietéticos seja mais reduzido e promovendo-as ao desenvolvimento de hipocalcemia. Deve-se ter também presente de que não é apenas uma condição corporal excessiva que predispõe à hipocalcemia, vacas extremamente magras ou magras, também desenvolvem hipocalcemia, o motivo pelo qual é que ainda não está definido (Roche *et al.*, 2009).

Na figura 4, vemos um exemplo de um animal, cuja condição corporal é de 3,25 na escala de 1 a 5.

**Figura 4** – Animal de condição corporal 3.25 tendo em conta a escala de 1 a 5. Ligamento sacral e ligamento da cauda visíveis. Barcelos, 2018

### 3.8 Duração período seco

Segundo a literatura, a duração do período seco não tem grande impacto na incidência de hipocalcemia clínica, isto em períodos entre 30 e 60 dias. Santschi *et al.*, (2009), realizaram um estudo em que comparavam dois grupos sujeitos a uma duração do período seco diferentes. Um grupo foi sujeito a 35 dias de período seco e um outro a 60 dias, aquilo que se verificou a nível da incidência da hipocalcemia é que, entre os dois grupos, não havia uma diferença significativa.

Contudo, deve-se ter sempre presente, que quando se fala de períodos secos de 2- 3 meses, já se poder observar um aumento da incidência da hipocalcemia clínica. Isto porque quando se expõe um animal a um período de secagem longo, este tem uma predisposição para aumentar a sua condição corporal, dificultando a sua manutenção que é um dos principais objetivos na secagem. Tal ocorre uma vez que a vaca não consegue regular a sua ingestão com as suas necessidades fisiológicas (Morrow *et al.*, 1979; Thilsing-Hansen *et al.*, 2002; Garcia, 2012).

### 3.9 Consequências Clínicas da hipocalcemia

Tanto a hipocalcemia clínica como a subclínica agem como "*gateway diseases*", já que a sua presença está ligada a muitos outros distúrbios da vaca em transição (Mulligan *et al.*, 2008). Em 2003, Ingvarsten *et al.*, realizaram um estudo em que demonstraram que o período de maior incidência de doenças puerperais ocorre nos primeiros 10 dias pós-parto, sendo este o período de maior risco para o desenvolvimento de doenças (Mulligan *et al.*, 2008). Já Block, em 1984, demonstrou que vacas que sofrem de hipocalcemia clínica no pós-parto imediato, têm uma redução de 14% na sua produção comparativamente a vacas com níveis séricos de Ca normais.

A hipocalcemia clínica (níveis de Ca < 1.38 mmol/L) e hipocalcemia subclínica (níveis entre 1.38 e 2.0 mmol/L) são fatores de risco para muitas doenças puerperais entre as quais mastite, cetose, retenção placentária, deslocamento de abomaso e prolapso uterino (DeGaris and Lean, 2008). Nas vacas que demonstraram hipocalcemia clínica, foi verificado que são oito vezes mais propensas a desenvolverem mastite na lactação seguinte, três vezes mais propensas a desenvolverem distocia e duas a quatro vezes mais propensas ao deslocamento de abomaso (Mulligan *et al.*, 2006). Além disso, vacas que tenham desenvolvido hipocalcemia clínica tem uma redução na produção de leite nas primeiras 4-6 semanas comparativamente às vacas que não sofreram hipocalcemia (Rajala-Schultz *et al.*, 1999; DeGaris and Lean, 2008).

As doenças puerperais estão correlacionadas entre si. Por exemplo, a cetose e a hipocalcemia clínica além de estarem relacionadas entre si estão também relacionadas com a retenção placentária (Houe *et al.*, 2003). Devido a esta inter-relação, as doenças puerperais acabam por resultar numa cascata, cujos efeitos de uma aumentam a incidência de outra, reduzindo a fertilidade, a produção leiteira e aumentando a probabilidade de desenvolvimento de laminite (Mulligan *et al.*, 2008)

### **3.9.1 Distocia**

A distocia está associada a dor aguda intensa e é um dos problemas de bem-estar mais significativos nas explorações de vacas leiteiras. Enquanto que nas vacas primíparas a desproporção feto-pélvica é o fator de risco predominante, nas vacas multíparas a má posição fetal é o fator de risco mais importante (Mulligan *et al.*, 2008).

Vários estudos têm comprovado a correlação existente entre a hipocalcemia e a distocia. Em alguns casos, a probabilidade de distocia em vacas com hipocalcemia chega a ser até seis vezes maior comparativamente a vacas normocalcemicas. No entanto o que é mais vezes referido na literatura disponível é um aumento de probabilidade que ronda os 2,5-3 (Curtis *et al.*, 1983; Erb *et al.*, 1985; Correa *et al.*, 1993; Mulligan *et al.*, 2006). Os partos distócicos surgem associados à hipocalcemia essencialmente devido a uma diminuição da motilidade uterina (Houe *et al.*, 2001) e a um enfraquecimento das contrações uterinas que provoca uma deficiência na dilatação do colo uterino durante o parto (Noakes *et al.*, 2009; Garcia, 2012)

### **3.9.2 Prolapso uterino**

As vacas que tenham desenvolvido prolapso uterino, normalmente, apresentam baixos níveis de cálcio sérico (Risco *et al.*, 1984; Mulligan *et al.*, 2006). Em 2006, Mulligan *et al.*, demonstraram que 19% das vacas com prolapso uterino encontravam-se numa condição de hipocalcemia grave, com níveis séricos de Ca abaixo dos 4mg/dL, enquanto que 28% dos animais afetados estavam num estado de hipocalcemia moderada, com níveis entre os 4,1 e os 6,0 mg/dL. Houe *et al.*, (2001), concluiu que a associação do prolapso uterino com a hipocalcemia se devia a uma redução da motilidade uterina e ao atraso da involução cervical.

### **3.9.3 Retenção placentária**

Vários estudos demonstram que vacas com hipocalcemia clínica tem um risco aumentado, até três vezes superior, de desenvolverem retenção placentária comparando com vacas normocalcemicas (Houe *et al.*, 2001; Mulligan *et al.*, 2006). A expulsão da placenta ocorre durante o terceiro estadio do parto, com uma duração de até 6 horas. Esta deve-se a fatores mecânicos, hormonais e imunitários (Hanafi *et al.*, 2011).

Sheldon *et al.*, 2008, referiram que a incidência da retenção placentária numa exploração situa-se normalmente entre os 2% e os 5%, mas esta pode aumentar perante situações como um parto gemelar, distocico ou em que haja a intervenção de agentes infecciosos. Em 2013, Kosh, reportou que a incidência de retenção placentária em Portugal era

de 12,5%. A retenção placentária ocorre devido a uma incompleta separação entre as carúnculas maternas e os cotilédones fetais (Smith, 2007) ou a uma falha dos mecanismos de expulsão. No entanto, a maior parte dos casos de retenção placentária ocorrem devido a incompleta separação dos placentomas (Grunert, 1980).

A expulsão da placenta envolve três componentes. A maturação da placenta, associada a alterações endócrinas que ocorrem durante o parto; o colapso e retração das vilosidades; a separação das criptas e por fim as contrações uterinas com deformação dos placentomas e expulsão da placenta (Borel *et al.*, 2006). As principais causas patofisiológicas da retenção placentária são placentomas prematuros, edema das vilosidades coriônicas, placentite e atonia uterina (Gustafsson *et al.*, 2004).

Em 2004 Melendez *et al.* relataram uma redução significativa da concentração plasmática de cálcio em vacas com membranas fetais retidas em comparação com as vacas com expulsão placentária normal. De notar que a hipocalcemia demonstrada pelas vacas com retenção placentária era subclínica e não clínica. Verificou-se assim uma clara ligação entre a hipocalcemia e a retenção placentária (Mulligan *et al.*, 2006).

A imunossupressão, experienciada pelos animais com níveis de cálcio inferiores ao normal, pensa-se ser a principal causa de retenção placentária (Mulligan *et al.*, 2008). Por outro lado, a principal consequência das infeções uterinas e retenção da placenta é o baixo desempenho reprodutivo, que é a chave para a redução do lucro numa exploração leiteira (Mulligan *et al.*, 2008).

#### **3.9.4 Mastite**

A hipocalcemia reduz a resposta imunitária na medida em que há uma diminuição da resposta por parte das células imunitárias face a agentes infecciosos (Kimura *et al.*, 2006). Tal situação predispõe ao desenvolvimento de processos infecciosos como sendo as mastites. Quando uma vaca tem hipocalcemia verifica-se a existência de uma redução da contração do músculo esquelético e liso (Mulligan *et al.*, 2006), facilitando a entrada de agentes infecciosos através do esfíncter, aumentando assim o risco de mastite (Goff, 2014). Além disso, as suas reservas de Ca intracelular das células mononucleares periféricas estão diminuídas o que faz com que a sua libertação, necessária na resposta a sinais de ativação pelas células imunitárias, fique condicionada, contribuindo para uma imunossupressão no peri-parto (Kimura *et al.*, 2006).

### 3.9.5 Metrite e endometrite

A metrite é uma doença definida como sendo uma reação inflamatória das camadas do útero envolvendo a mucosa endometrial, a submucosa e a muscular (Bondurant, 1999). A endometrite, por sua vez, apenas envolve o endométrio e o estrato esponjoso da submucosa (Noakes *et al.*, 2009). Sheldon *et al.*, 2006, definiram metrite puerperal como sendo uma doença sistêmica aguda, em que o animal apresenta inflamação uterina com aumento anormal do útero, corrimento fétido e aquoso, durante os primeiros 21 dias pós-parto. Nos casos mais graves, podem observar-se também anorexia, inapetência, taquicardia e algum grau de desidratação.

A relação entre a hipocalcemia e a endometrite foi estudada por Kimura e colegas, em 2006, uma vez que as vacas que no seu pré-parto sofram de uma hipocalcemia marcada, sofre também de uma imunossupressão marcada. Whiteford e Sheldon, em 2005, observaram que a taxa de incidência de endometrite em vacas do Reino Unido, que sofreram hipocalcemia clínica, era significativamente maior em comparação com vacas normocalcemicas.

Martinez *et al.*, realizaram um estudo em 2012, em observaram que a hipocalcemia subclínica afetava negativamente a função dos neutrófilos e concluíram também que o risco do desenvolvimento de metrite aumentava em 22% por cada decréscimo de 1 mg/dL de Ca sérico abaixo dos 8,59 mg/dL. Esta doença acarreta para o produtor não só perdas económicas diretas, relacionadas com o tratamento, como também perdas económicas indiretas uma vez que há um aumento dos dias em aberto e um aumento do intervalo entre partos.

### 3.9.6 Cetose

Entende-se a cetose, clínica ou subclínica, como uma doença metabólica cuja causa é um aporte energético insuficiente para o normal funcionamento do organismo da vaca leiteira. Tal situação conduz a um balanço energético negativo que se não for repostado poderá levar ao aumento da concentração de corpos cetónicos e de ácidos gordos não esterificados (AGNE) com consequências negativas para o animal. De notar que é normal ocorrer um ligeiro balanço energético negativo no pré-parto e no início da lactação, devido a uma exigência energética súbita que a lactação exige. No entanto, para colmatar esta situação, os mecanismos de homeostasia que visam repor e equilibrar a energia necessária ao normal funcionamento do organismo são ativados. Caso estes mecanismos falhem ou estes sejam insuficientes para manter a homeostasia, a manutenção do balanço energético negativo poderá trazer graves consequências à saúde da vaca (Scott *et al.*, 2011).

As vacas com hipocalcemia subclínica tem uma elevada taxa de mobilização de gordura corporal resultando em elevadas concentrações de AGNE aumentando assim o risco de cetose e de deslocamento do abomaso (Goff, 2014).

### **3.9.7 Doenças aparelho digestivo**

Vários autores defendem que quando perante uma situação de hipocalcemia, quer seja ela clínica ou subclínica, esta conduz a uma redução da contração muscular, a nível do musculo liso, resultando numa diminuição da motilidade abomasal e numa redução da atividade ruminal, que podem resultar num deslocamento de abomaso e numa redução da ingestão (Daniel, 1983; Jorgensen *et al.*, 1998; Goff, 2008). Tal situação revela-se de extrema importância quando estamos perante vacas leiteiras de alta produção, uma vez que estas necessitam de ingerir um maior volume de alimento para colmatar as suas exigências metabólicas. Uma diminuição deste volume, resultante de uma redução da motilidade do rúmen e do abomaso, acarreta consigo consequências significativas (Mulligan *et al.*, 2006).

Goff, em 1996, alerta para o facto de que devemos ter sempre presente de que os efeitos da hipocalcemia sobre a motilidade ruminal podem fazer-se sentir durante a primeira semana pós-parto, exacerbando o balanço energético negativo em que a vaca se encontra. Tendo em consideração este facto, entende-se o aumento da probabilidade de ocorrência de cetose consecutivo a uma situação de hipocalcemia (Houe *et al.*, 2001).

#### **3.9.7.1 Deslocamento do Abomaso**

Esta doença é caracterizada por uma dilatação do abomaso com fluído e gás, o que promove o deslocamento da sua posição fisiológica, no chão da cavidade abdominal, ligeiramente à direita ao nível do joelho, para uma posição patológica, podendo ser, ou não, acompanhado de torção do mesmo no sentido dos ponteiros do relógio (Steiner, 2006). O deslocamento do abomaso é uma doença de carácter multifatorial (Stengärde *et al.*, 2010) sendo a sua relação com a hipocalcemia complexa. Estas encontram-se interligadas, de modo a que uma pode conduzir ao desenvolvimento da outra e vice-versa. Normalmente, as vacas desenvolvem deslocamento do abomaso no primeiro mês pós-parto (Steiner, 2006).

A verdade é que ainda hoje não se consegue compreender exatamente a relação existente entre hipocalcemia e deslocamento do abomaso. Em 2002, Stenguård and Pehrson demonstraram que 96,5% das vacas com deslocamento do abomaso apresentavam níveis de Ca séricos inferiores a 2,0 mmol/L. Contudo, LeBlanc *et al.*, em 2005, realizaram um estudo de modo a tentarem relacionar os níveis de Ca *ante partum* com a incidência de deslocamento do abomaso e concluíram que não existia relação entre estas doenças.

### 3.9.8 Subfertilidade

A hipocalcemia é um importante fator de risco direto para o desenvolvimento de doenças do sistema reprodutivo e um fator indireto para um aumento do refugo (Erb *et al.*, 1985; Stevenson and Call, 1988). Assim, esta doença, ainda que indiretamente, provoca uma redução da fertilidade por ser um fator de risco para doenças como a retenção placentária, metrite e endometrite, que tem repercussões na fertilidade das vacas leiteiras (Mulligan *et al.*, 2006).

As vacas com hipocalcemia subclínica tem um risco aumentado de desenvolverem «Fígado gordo» e a sua fertilidade é menor quando comparada a uma vaca normocalcêmica (Chamberlin *et al.*, 2013).

Em 1999, Kamgapor *et al.*, demonstraram que vacas com hipocalcemia subclínica apresentavam aos 15, 30 e 45 dias pós-parto, um menor número de folículos ovulatórios. Verificaram ainda que, os folículos ovulatórios na primeira ovulação eram de menor tamanho comparativamente aos folículos de animais saudáveis, que não tinham desenvolvido a doença (Mulligan *et al.*, 2006).

Tem se verificado um efeito indireto da febre do leite sobre os quistos ováricos, devido à ocorrência de metrites (Erb *et al.*, 1895; Houe *et al.*, 2001). Estes são estruturas foliculares que falham na ovulação e que vão persistindo dentro do ovário levando a uma função reprodutiva anormal (Noakes *et al.*, 2009) que conseqüentemente acarreta consigo um aumento do intervalo entre partos (Erb *et al.*, 1985; Houe *et al.*, 2001) traduzindo-se numa subfertilidade do animal.

#### **4. Objetivos do trabalho**

Sendo a hipocalcemia um fator predisponente ao desenvolvimento de doenças puerperais, que leva também a uma diminuição da produção leiteira e que acarreta prejuízos económicos ao produtor, o principal objetivo deste trabalho foi a avaliação da calcemia em 5 explorações na ilha Terceira e em 6 explorações no concelho de Barcelos, com a avaliação da incidência de hipocalcemia, clínica e subclínica, no período estudado. No concelho de Barcelos, foi-nos possível avaliar a incidência de algumas doenças puerperais. As outras doenças registadas em Barcelos foram retenção placentária, metrite, mamite e cetose. Avaliou-se também a condição corporal dos animais no momento do parto e a sua relação com a calcemia.

O segundo objetivo consistiu na formulação de hipóteses e verificação estatística dos fatores que estariam associados aos resultados obtidos, nomeadamente que fatores estavam associados à calcemia e às doenças observadas.

Avaliou-se também os tratamentos metabólicos pré-parto utilizados e qual o seu impacto no desenvolvimento das doenças puerperais.

Por último, foi ainda objetivo deste trabalho avaliar a relação entre os níveis séricos de Mg no pós-parto imediato com os níveis de Ca e verificar qual relação entre os dois.

Como principais limitações do estudo, podemos indicar o reduzido período de tempo para a recolha das amostras, a necessidade de usar diferentes métodos para um primeiro processamento das amostras e o tamanho relativamente reduzido da amostra, em relação à população das bacias leiteiras em que estavam integradas.



## 5. Material e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido na ilha Terceira, arquipélago dos Açores e no concelho de Barcelos, região do Entre Douro e Minho. Dos 110 animais da amostra, 109 eram da raça *Holstein Frisia* e apenas 1 da raça *Jersey*. As recolhas foram realizadas entre 1 de outubro de 2017 a 1 de maio de 2018.

Os critérios de inclusão foram:

1. cada exploração tinha que ter 4-5 primíparas e ter 5-6 pluríparas para parir no período anteriormente referido;
2. as recolhas teriam de ser realizadas nas primeiras 6h pós-parto;
3. a não administração de cálcio antes da colheita.

A colheita de sangue venoso (3 ml) foi realizada na veia jugular, veia mamária ou na veia coccígea, para tubos secos siliconados de extração de sangue a vácuo, tipo *Falcon*, com auxílio de um adaptador, designado como flebótomo, que permitia acoplar uma agulha de 18G. Posteriormente, realizou-se a centrifugação e por fim fez-se a colheita do soro para um *ependorf* com auxílio de pipetas descartáveis de *Pasteur*. O soro foi congelado a uma temperatura entre os -18°C e os -20°C e manteve-se armazenado até serem completadas as 110 amostras.

Devido ao facto de na ilha Terceira não haver uma centrífuga disponível para realizar a centrifugação das amostras, após a recolha do sangue deixou-se coagular a amostra a uma temperatura de -4°C durante 24h sendo posteriormente, com o auxílio de uma pipeta descartável de *Pasteur*, decantados 2 ml de soro para um *ependorf* que posteriormente era congelado a uma temperatura compreendida entre os -18°C e os -20°C.

Quando se terminou a recolha das amostras, procedeu-se à análise de todos os soros armazenados. Assim, as 110 amostras foram descongeladas a uma temperatura ambiente (entre os 20°C e os 25°C) e depois analisadas.

Uma grande parte dos produtores da ilha Terceira estava familiarizada com a doença, como tal tinha por hábito proceder à administração de Ca (IV ou SC) imediatamente após o parto, nos animais com três ou mais gestações. Assim, foi previamente esclarecido, por forma a não influenciar os resultados, de que só poderiam executar a administração de Ca após a recolha do sangue. Existia também o hábito de administrar vitamina D<sub>3</sub> (Duphafra<sup>®</sup> D<sub>3</sub>1000) nos 3-4 dias que antecediam o parto, e por isso, foi esclarecido que todos os animais a que fosse administrado teria que ser comunicada essa informação.

Os produtores de Barcelos não tinham por hábito administrar a vitamina D<sub>3</sub> antes do parto, contudo, alguns tinham o hábito de administrar no dia do parto, logo após o mesmo.

Assim foi-lhes pedido que se realizasse a colheita antes da sua administração. O mesmo se verificava com a administração IV de Ca, a maioria apenas fazia a administração subcutânea, assim, foram também esclarecidos no sentido de que era necessário colher a amostra antes de qualquer administração de Ca por qualquer uma das vias de administração disponíveis.

Por forma a se poder comparar os animais entre si, foram recolhidos dados relativamente à data de nascimento, data de parto, idade, número de partos, condição corporal medidas profiláticas implementadas. Foram também registados nos primeiros 30 dias pós-parto o diagnóstico de algumas doenças, como febre vitular/decúbito, retenção placentária, prolapso uterino, metrite (aos 8 e 15 dias pós-parto), mastite (no dia do parto, aos 8 e 15 dias pós-parto), e por fim cetose ou deslocamento de abomaso.

Infelizmente, na ilha Terceira não foi possível recolher uma informação tão completa e detalhada, pelo que a recolha de dados apenas abrangeu a data de nascimento, data de parto, idade, número de partos, se apresentaram decúbito e à administração de vitamina D<sub>3</sub> antes do parto.

A seleção das explorações foi realizada por forma a ser obtida uma amostragem homogênea tanto da ilha Terceira como do concelho de Barcelos. Para isso, selecionaram-se as explorações tendo em atenção a sua localização. Contudo, no concelho de Barcelos essa distribuição acabou por não ser tão homogênea por uma questão de logística. Se uma exploração não reunia as 10 amostras ou se não foram realizadas 4 amostras a novilhas, no mínimo, a exploração era excluída, como aconteceu com uma exploração em Barcelos que não reuniu as 10 amostras e que foi posteriormente substituída por outra.

Definiu-se como normocalcemia a concentração de cálcio sérico igual ou superior a 2.0 mmol/L (ou seja, entre 8,1 mg/dL e 10 mg/dL) (Venjakob *et al.*, 2017). As vacas, mesmo que sem sinais clínicos, com concentrações séricas entre os 1.38 mmol/L e os 2.0 mmol/L (entre os 8mg/dL e os 5,5mg/dL) foram categorizadas como tendo hipocalcemia subclínica. Aquelas cuja concentração sérica de Ca seja inferior a 1.38 mmol/L (< 5,5mg/dL), foram categorizadas como tendo hipocalcemia clínica (DeGaris and Lean, 2008; Goff, 2014).

No que toca aos valores de Mg definiu-se que, quando estes eram inferiores a 1,6mg/dL, o animal encontrava-se em hipomagnesemia e perante um fator de risco para o desenvolvimento de hipocalcemia clínica (Sansom *et al.*, 1983; Lean *et al.*, 2006; Neves *et al.*, 2017).

O armazenamento dos soros colhidos assim como a análise dos mesmos foi realizado no laboratório Segalab, Laboratório de Sanidade Animal e Segurança Alimentar, S.A, sediado em Argivai, Vila do Conde.

O método de ensaio para a análise dos níveis de Ca foi o ABX Pentra Calcium AS CP. Este é um reagente de diagnóstico para a determinação quantitativa *in vitro* de Ca no soro,

plasma e urina por colorimetria. No presente trabalho foi utilizado o soro. O reagente de diagnóstico ABX Pentra Calcium AS CP, associado a um calibrador e controlos, é um reagente de diagnóstico para a determinação quantitativa *in vitro* de cálcio em soro, com base num método colorimétrico, utilizando o analisador de química clínica ABX Pentra 400.

O método utilizado neste trabalho baseou-se no metalocromogénio Arsenazo III. Os iões de cálcio reagem com o Arsenazo III (2,2'-[1,8-Diidroxi-3,6-disulfonaftileno-2,7-bisazo]-ácido bisbenzenoarsónico) ao pH 6,75 para formar um cromóforo na coloração púrpura intensa. A absorvância do complexo Ca-Arsenazo III é medida bicromaticamente a 660/700 nm. O aumento resultante na absorvância desta mistura da reação é directamente proporcional à concentração de cálcio presente na amostra. O Arsenazo III possui alta afinidade com os iões de cálcio e não apresenta interferência com outros catiões normalmente presentes no soro.

O método de ensaio para a análise dos níveis de Mg foi o ABX Pentra Magnesium RTU. Este é um reagente de diagnóstico para a determinação quantitativa, *in vitro*, de Magnésio no soro ou plasma por colorimetria. No presente trabalho foi utilizado o soro. O reagente de diagnóstico ABX Pentra Magnesium RTU destina-se à determinação quantitativa *in vitro* de magnésio com base num teste fotométrico, usando azul de xilidil. Os iões de magnésio formavam um complexo colorido púrpura com o azul de xilidil em solução alcalina. Na presença de Glicoleterdiamina - ácido tetraacético (GEDTA), que faz complexo com os iões de cálcio, a reação é específica. A intensidade da cor púrpura é proporcional à concentração de magnésio

A administração de Vitamina D<sub>3</sub>, a administração de um dispositivo intrarruminal de libertação contínua de monensina (Kexxtone®) e a administração de imunomoduladores que restauram a resposta imunitária inata no peri-parto (Imrestor®) foram considerados como sendo tratamentos metabólicos pré-parto enquanto que a administração de Pasta/Drench oral e de fluídos no pós-parto imediato foram considerados como tratamentos metabólicos pós-parto.

## 5.1 Caracterização das explorações

### a) Terceira

Foram escolhidas 5 explorações caracterizadas por um maneio típico dos Açores, em que os animais pastoreiam todo o ano sem que haja a sua estabulação. A alimentação era à base de pastagem (essencialmente azevém e trevo branco) suplementada com silagem de milho, silagem de erva e/ou rolo de erva e concentrado.

A mistura das silagens de milho e erva era realizada com auxílio de uma máquina misturadora designada vulgarmente como *Unifeed*. Apenas uma das explorações tinha

balança incorporada na máquina misturadora. Todas as explorações realizavam a distribuição da mistura após a primeira ordenha do dia, num parque de alimentação contíguo à sala de ordenha, havendo apenas duas que repetiam a distribuição da alimentação após a ordenha da tarde. O concentrado era fornecido na ordenha havendo apenas uma exploração que também adicionava na mistura do *Unifeed*.

Todas estas explorações possuíam sala de ordenha fixa e realizavam 2 ordenhas diárias espaçadas entre si por 10-12 horas. Os animais secos assim como as novilhas encontravam-se separadas dos animais lactantes alimentando-se da pastagem e da silagem de milho que os produtores distribuem nos cercados.

Relativamente às medidas profiláticas para a hipocalcemia, todas as explorações dispunham de um protocolo profilático. A administração de vitamina D<sub>3</sub> após a terceira lactação era uma medida profilática comum a todas estas explorações. A administração de Ca por via intravenosa era também uma prática comum nos produtores terceirenses, nestas 5 explorações apenas uma procedia a esta prática por rotina a todos os animais a partir da 3<sup>a</sup> lactação. As restantes 4 procediam a administração IV de Ca apenas se o animal apresenta decúbito, se detinha um histórico de hipocalcemia clínica ou então em animais mais velhos, a partir da 5<sup>a</sup> lactação. A mesma exploração que administrava Ca IV procedia também à administração oral de um Bolús de Ca a todos os animais a partir da 3<sup>a</sup> lactação. Uma das explorações apresentava também como prática profilática a administração de um *drench* oral de Ca (cuja composição para além de Ca, abrange também Mg, K e niacina) a todos os animais a partir da 3<sup>a</sup> lactação.

#### b) **Barcelos**

Foram escolhidas 6 explorações caracterizadas por um maneio típico da produção leiteira do Entre-Douro e Minho em que os animais estavam permanentemente estabulados durante todo o ano.

A alimentação era à base de silagem de milho, silagem de erva e/ou rolo de erva e concentrado. Assim como na ilha Terceira, todas as explorações dispunham de um *Unifeed* (com balança, sendo que uma das explorações tinha a balança avariada) que permitia a mistura da silagem de milho, silagem de erva, concentrado e palha. Apenas 2 explorações forneciam todo o concentrado unicamente na mistura do *Unifeed* enquanto que as restantes explorações realizavam a distribuição do concentrado no *Unifeed* e em *Boxes*, que estavam distribuídas pelo estábulo. Tal permitia adequar a quantidade de concentrado fornecido a cada animal e permite fazê-lo de forma individualizada, tendo como guia uma tabela que associa a sua produção leiteira com o concentrado que pode ser disponibilizado na *Box*. A distribuição

da alimentação era realizada duas vezes por dia, após cada ordenha, e era feita num corredor de alimentação presente no estábulo.

Todas estas explorações realizavam 2 ordenhas diárias espaçadas entre si 12 horas. De todas estas explorações, apenas uma não fazia separação dos animais secos dos animais lactantes, sendo que no período seco os animais alimentavam-se da mistura do *Unifeed* e do concentrado (disponibilizado na mistura *Unifeed*) dos animais lactantes.

Relativamente às medidas profiláticas para a hipocalcemia, nem todas as explorações dispunham de um protocolo profilático. Uma das explorações tinha um protocolo delineado, em que administrava oralmente Ca (forma comercial de uma pasta oral) nas primeiras 6h pós-parto a todos os animais a partir da 3ª lactação, administrando também Ca subcutâneo nos primeiros 3 dias pós-parto. A administração de Ca IV acontecia apenas em animais que apresentassem decúbito ou tivessem um historial de hipocalcemia, associando também a administração de vitamina D<sub>3</sub>. A mesma exploração disponibilizava uma dieta DCAD durante o período de secagem (2 meses). As restantes explorações apenas procediam à administração de Ca quer oral, subcutâneo, intravenoso assim como a administração de vitamina D<sub>3</sub> apenas se necessário, ou seja, apenas se o animal apresentava decúbito ou outro sinal clínico compatível com a hipocalcemia, se o animal já tinha histórico de hipocalcemia clínica ou se era velho (5ª lactação).

Alguns promoviam a administração de Ca subcutâneo juntamente com a administração de Cloprostenol, se verificavam que o animal fazia retenção placentária. Uma das explorações tinha por rotina fazer fluidoterapia a todos os animais pós-parto, ou seja, administrava via IV soros salinos e complexos vitamínicos. Quando está perante um animal com mais de 4 lactações, por norma, também administrava Ca via subcutânea.

## **5.2 Tratamento estatístico dos dados**

Para a estatística descritiva, dos dados recolhidos, foi organizada uma base de dados em livros Excel - Microsoft® Office 2016 para o Windows 10 (Microsoft Corporation USA), através desta ferramenta os dados foram transpostos e organizados foram elaborados gráficos representativos de cada parâmetro correspondente aos dados disponíveis, recorrendo ao cálculo de frequências e percentagens relativas.

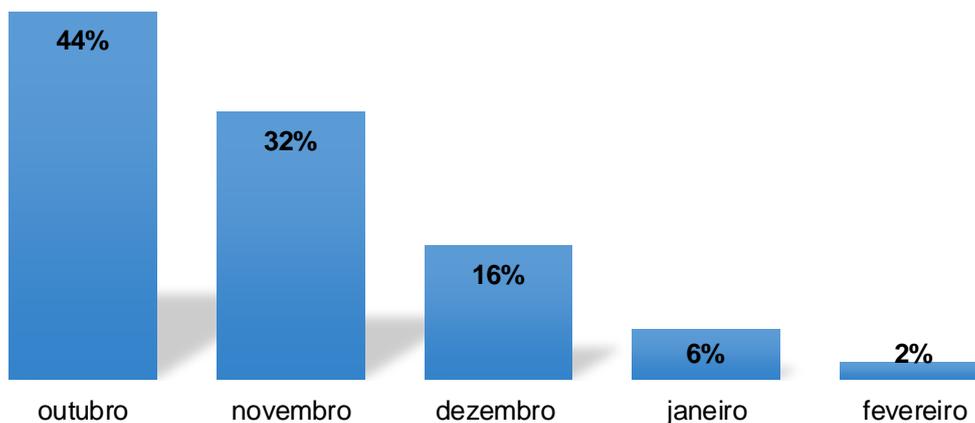
Para a elaboração da análise estatística analítica foi utilizado o *software* IBM® SPSS Statistics versão 20.0® (IBM Software, NY, USA) que permitiu fazer o tratamento estatístico dos dados, usando o teste do Qui-quadrado, teste exacto de Fisher, teste de Tuckey-Kramer HSD. As associações entre todas as variáveis foram calculadas por análise univariável de variância, com teste post-hoc de Bonferroni.

A associação entre os parâmetros estudados era considerada estatisticamente significativa quando  $P < 0,005$ .

## 6. Resultados e Discussão

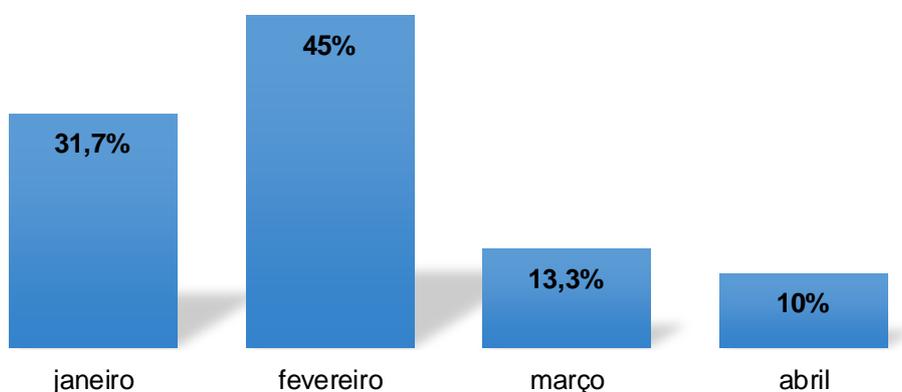
### 6.1. Cronologia das recolhas

Na figura 5, pode-se observar a distribuição das recolhas realizadas na Terceira (N = 50) durante o estágio, ao longo dos meses. Os meses de outubro e novembro foram os meses em que se verificaram uma maior incidência.



**Figura 5** – Incidência das recolhas na Terceira ao longo dos meses

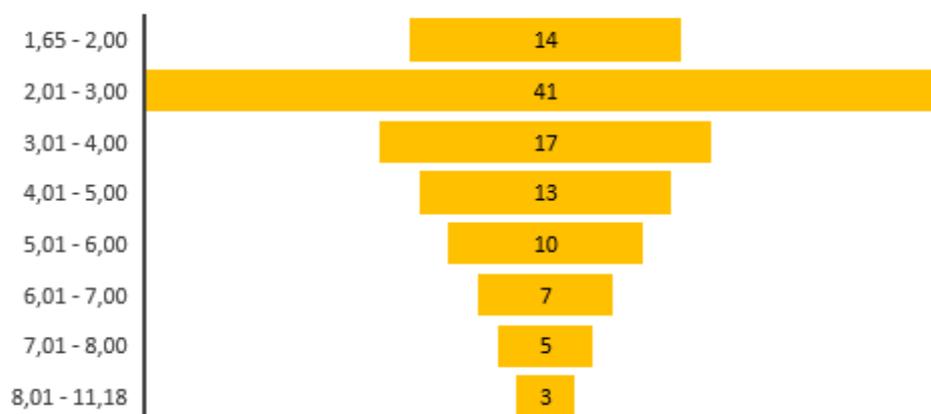
No concelho de Barcelos (N = 60) verificou-se que o mês de fevereiro foi o mês com maior incidência, seguindo-se o mês de janeiro, o de março, e por fim, o de abril (Figura 6).



**Figura 6** – Incidência das recolhas em Barcelos ao longo dos meses

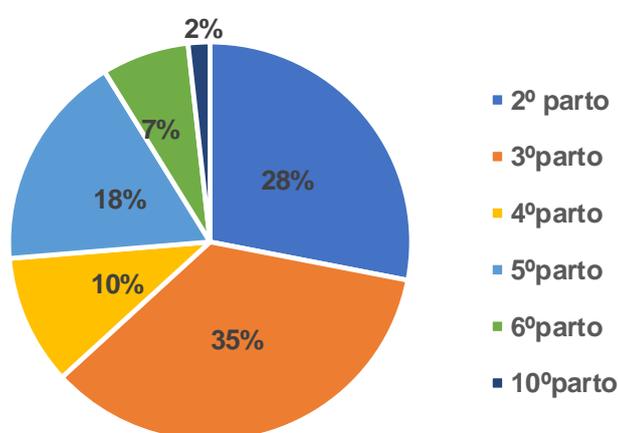
## 6.2. Idade e paridade

O número de partos variou entre 1 e 10, com uma média de  $2,30 \pm 1,67$  partos. A idade variou entre 1,65 anos e 11,18 anos, sendo a média das idades  $3,62 \pm 1,89$  anos. Verificou-se que a faixa etária com maior número de indivíduos foi a de 2,01 a 3,00 anos (41 animais compreendidos nesta faixa), seguindo-se a de 3,01 a 4,00 anos (17 animais) e a de 1,65 a 2,00 (14 animais). Na figura 7 pode-se observar a distribuição das idades dos 110 animais analisados pelas diferentes faixas etárias.



**Figura 7** – Distribuição das idades pelas diferentes faixas etárias.

Dos animais múltiparos, a distribuição do número de partos registados foi de 28% para o 2º parto (16/57), 35% para o 3º parto (20/57), 10% para o 4º parto (6/57), 18% para o 5º parto (10/57), 7% para o 6º parto (4/57) e, por fim, de 2% para o 10º parto (1/57) (Figura 8).



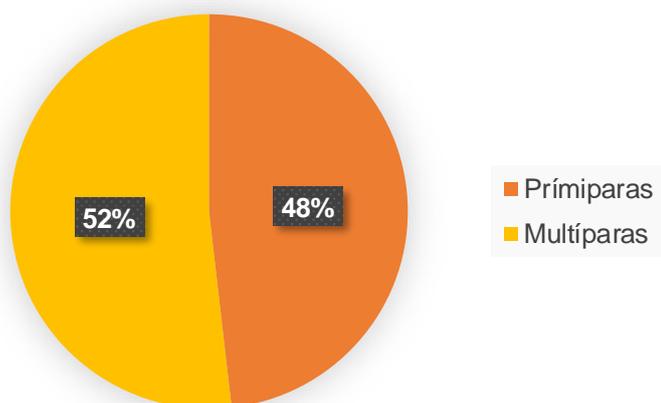
**Figura 8** –Número de partos registados nos animais múltiparos

A média do número de partos, das vacas observadas na ilha Terceira (N=50) foi ligeiramente superior ( $2,58 \pm 0,24$ ) à média do número de partos em Barcelos (N=60;  $2,07 \pm$

0,21). Após a 3ª lactação, inclusive, os animais têm uma maior dificuldade em manter a homeostasia do Ca e como tal há um decréscimo dos níveis de Ca com o aumento do número de partos (Goff, 2014) e da idade (Lean *et al.*, 2006; DeGaris and Lean, 2008).

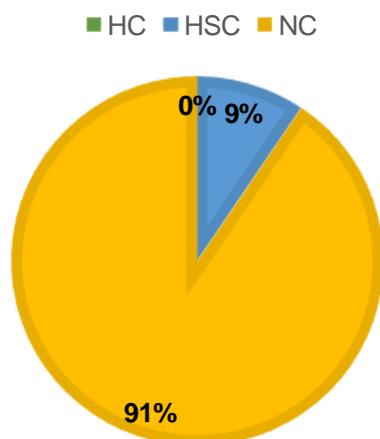
### 6.3. Calcemia

Durante o período delineado para o presente estudo foram feitas 110 recolhas, na figura 9 pode-se observar a distribuição dos animais primíparas e multíparas.



**Figura 9** – Distribuição da amostra em animais primíparas e multíparas

Na Figura 10, podemos observar a incidência de hipocalcemia nos animais primíparas (53/110) que constituíram a amostra.



**Figura 10** – Incidência da Hipocalcemia nos animais primíparas analisados

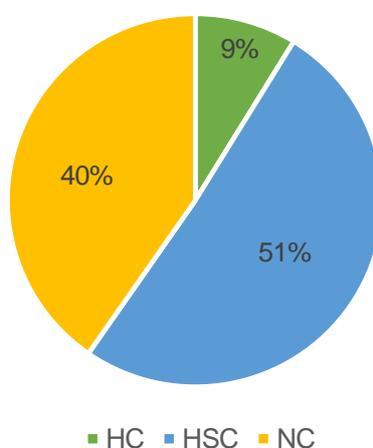
Segundo Houe *et al.* (2001), a incidência de hipocalcemia em animais da primeira lactação está próxima de 0%, havendo tendência a aumentar a partir do segundo parto. Contudo, em 2008, Goff *et al.*, e Reinhardt *et al.*, em 2011, referiram uma incidência de 25% de hipocalcemia

subclínica em animais de 1ª lactação. Reinhardt *et al*, (2011), referiram ainda uma incidência de 1% em hipocalcemia clínica. Recentemente, (2017), Venjakob *et al*, observaram que os animais primíparos não apresentaram hipocalcemia clínica, no entanto, foi observada uma incidência de 5,7% de hipocalcemia subclínica

Os resultados obtidos neste trabalho foram de encontro com os estudos mais recentes que referem existir incidência em hipocalcemia subclínica (HSC) nos animais primíparos. Constatamos que a incidência em HSC na amostra foi de 9%, sendo que nenhum animal primíparo apresentou hipocalcemia clínica (HC). A maioria dos animais apresentou uma normocalcemia (NC).

Relativamente aos animais múltiparos, verificou-se que a incidência de HC foi de 9% (5/57), a de HSC de 51% (29/57) e a de NC de 40% (23/57) (Figura 11).

Tendo em conta os presentes resultados, constatou-se que os animais múltiparos tiveram uma maior incidência de HSC comparativamente aos animais primíparos.

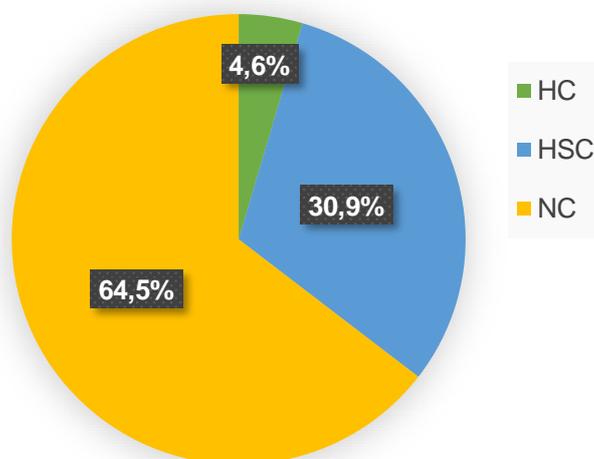


**Figura 11** – Incidência de Hipocalcemia Clínica, Hipocalcemia Subclínica e Normocalcemia nos animais múltiparos

No presente estudo verificou-se que, com o aumento do número de partos, os níveis de Ca tinham tendência a diminuir. Verificou-se uma associação significativa entre os níveis de Ca ( $P=0,001$ ; Fisher=15,43; Teste Exacto de Fisher) e o aumento do número de partos e, consequentemente, de lactações. O mesmo não aconteceu com os níveis de Mg ( $P=0,665$ ;  $R^2=0,038$ ; Teste Qui-quadrado), em que não se verificou nenhuma correlação estatística entre os níveis de Mg e o número de partos.

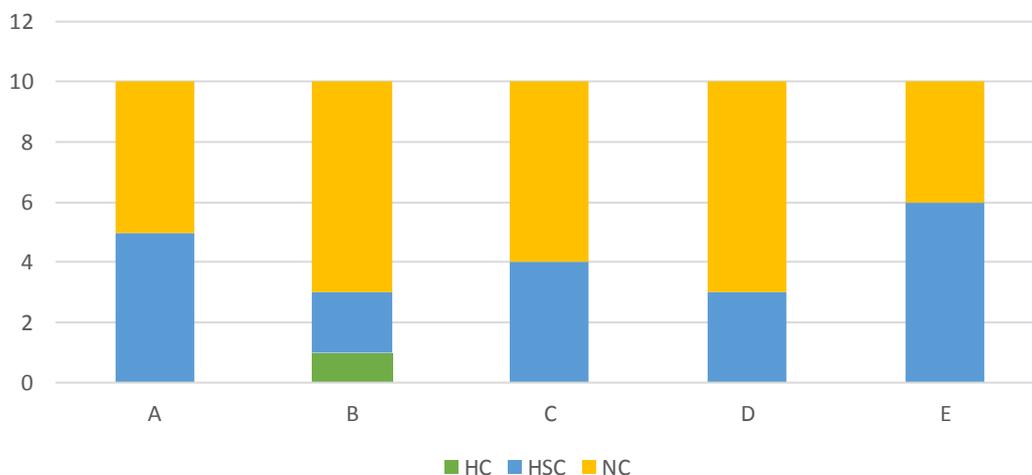
Dos 110 animais que constituíram a amostra do presente estudo, 4,6% (5/110) apresentaram níveis de Ca abaixo dos 5,5 mg/dL, sendo classificados como tendo hipocalcemia clínica (HC): a média dos níveis de Ca destes foi de  $4,42 \pm 0,68$  mg/dL; 30,9% (34/110) dos animais apresentaram níveis de Ca entre os 5,5 mg/dL e os 8 mg/dL, sendo classificados como tendo hipocalcemia subclínica (HSC) apresentando uma média de  $7,11 \pm$

0,71 mg/dL; 64,5% (71/110) dos animais apresentaram níveis de Ca superiores a 8 mg/dL e como tal foram classificados como tendo normocalcemia (NC) apresentando uma média de  $8,67 \pm 0,47$  mg/dL. Na figura 12, podemos observar incidência da hipocalcemia clínica, da hipocalcemia subclínica e da normocalcemia nos 110 animais deste estudo.



**Figura 12** - Frequência relativa da HC, HSC e NC

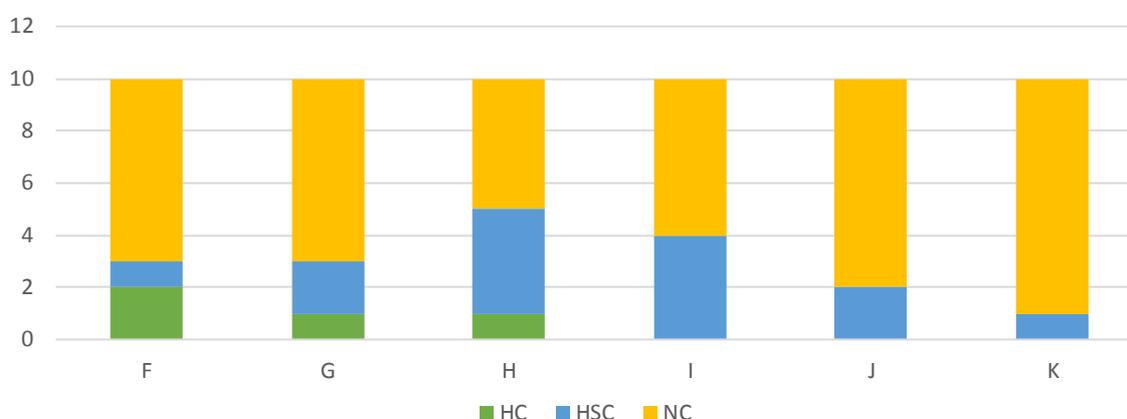
Relativamente à incidência da HC, HSC e NC, nas 5 explorações da ilha Terceira, verificou-se que apenas houve 1 animal classificado como HC na exploração B. Na figura 13, verificou-se que na exploração A, o número de animais HSC e NC foi igual (5 animais HSC e 5 animais NC), na exploração B, para além do animal HC, existiam 2 animais HSC e 7 animais NC. Na exploração C existiam 4 animais HSC e 6 animais NC. Na exploração D, existiam 3 animais HSC e 7 animais NC, e por fim, na exploração E, existiam 6 animais HSC e 4 NC.



**Figura 13** – Incidência da HC, HSC e NC nas explorações terceirenses.

Relativamente aos resultados das explorações em Barcelos verificou-se que existiram 4 animais que foram classificados com HC, 2 na exploração F, 1 na exploração G e 1 na

exploração H. Na exploração F, 1 animal HSC e 5 animais NC, na exploração G, 2 animais HSC e 5 animais NC. Na exploração H, 4 animais foram classificados como HSC e 5 animais NC. Na exploração I, 4 animais HSC e 6 animais NC e na exploração J, 2 animais classificados como HSC e 8 classificados como NC, e por fim, na exploração K, apenas 1 animal foi classificado como HSC e 9 animais NC (Figura 14).



**Figura 14** – Incidência da HC, HSC e NC nas explorações barcelenses.

Assim, 2% dos animais da ilha Terceira apresentaram-se com HC, 40% com HSC e 58% com NC. Dos animais de Barcelos, 7% apresentaram HC, 23% HSC e 70% NC. Verificou-se que existiam mais animais com HC (4/60) em Barcelos e mais animais com HSC (20/50) na ilha Terceira.

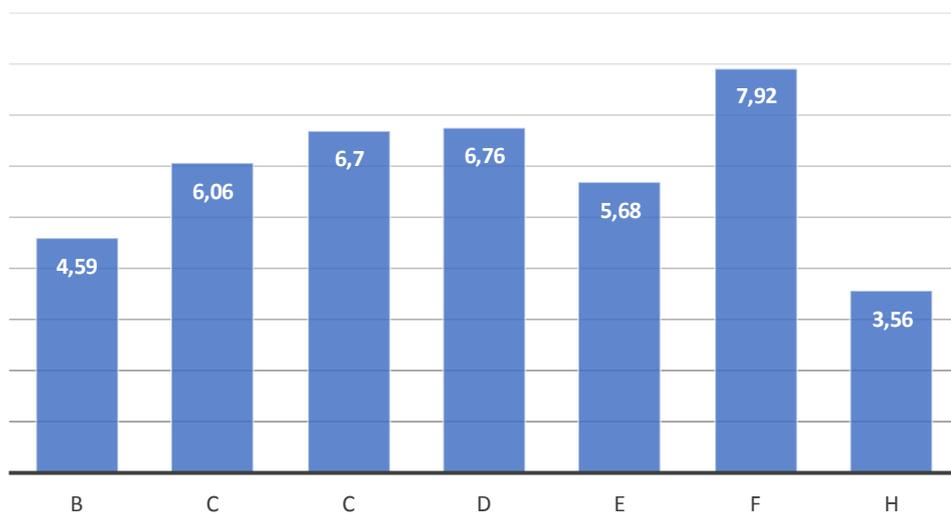
O facto de na ilha Terceira os animais estarem em regime de pastoreio, com uma alimentação rica em forragens, que interferem com a absorção do Mg e que podem levar a uma situação de alcalose metabólica. Numa situação de alcalose metabólica, a resposta à PTH é bloqueada (Gaynor *et al.*, 1989; Leclerc and Block, 1989; Goff *et al.*, 1991; Phillippo *et al.*, 1994; Goff *et al.*, 2008) e ocorre a diminuição quer da produção renal de  $1,25 (OH)_2D_3$  quer da reabsorção óssea, predispondo o animal a hipocalcemia (Craigie and Stoll, 1947; Goff *et al.*, 2008). Esta poderia ser uma hipótese para existir uma maior incidência de hipocalcémias nos Açores, contudo o presente estudo, indica-nos que o fator localização (ilha Terceira ou Barcelos) não teve interferência significativa ( $P=0,519$ ; Fisher=0,417; Teste Exacto de Fisher) nos níveis de Ca apresentados pelos animais. Em Barcelos, os animais não estão em pastoreio, contudo, as forragens fazem também parte da sua dieta. No entanto, há uma restrição de forragens verdes na mistura formulada.

No presente trabalho, os níveis de Ca variaram entre um mínimo de 3,56 mg/dL e um máximo de 9,85 mg/dL, sendo que a média dos resultados foi de  $7,99 \pm 1,19$  mg/dL. No que

toca aos níveis de Mg, os níveis variaram entre um mínimo de 1,54 mg/dL e um máximo de  $4,22 \pm 0,41$  mg/dL.

Com o aumento da idade há um aumento do risco de hipocalcemia (Lean *et al.*, 2006; DeGaris and Lean, 2008), uma vez que com a capacidade de homeostasia do Ca vai ficando comprometida (Goff, 2014). Assim, à medida que os animais vão envelhecendo, os seus níveis de Ca vão diminuindo (Horst *et al.*, 1990; DeGaris and Lean, 2008; Goff, 2014) situação que se verificou no presente estudo. Constatou-se que existia uma associação negativa ( $P=0,001$ ) entre os níveis de Ca e a idade, contudo, e devido à grande variabilidade da amostra, a qualidade do modelo foi baixa ( $R^2=0,274$ ; Teste Qui-quadrado) o que condicionou a sua validade.

Dos 7 animais que apresentaram decúbito, verificou-se que dois eram de explorações localizadas em Barcelos, nomeadamente, da Exploração F (com 7,92 mg/dL de Ca) e da Exploração H (com 3,56 mg/dL de Ca). Os restantes 5 animais eram de explorações localizadas na ilha Terceira, nomeadamente, um animal da Exploração B (com 4,59 mg/dL de Ca), dois animais da Exploração C (com 6,06 mg/dL e 6,70 mg/dL de Ca, respectivamente), um animal da Exploração D (com 6,76 mg/dL de Ca) e por fim, um animal da Exploração E (com 5,68 mg/dL de Ca) (Figura 15). Verificou-se também, que dos animais que apresentaram decúbito, dois apresentavam HC enquanto que os restantes cinco apresentavam HSC.

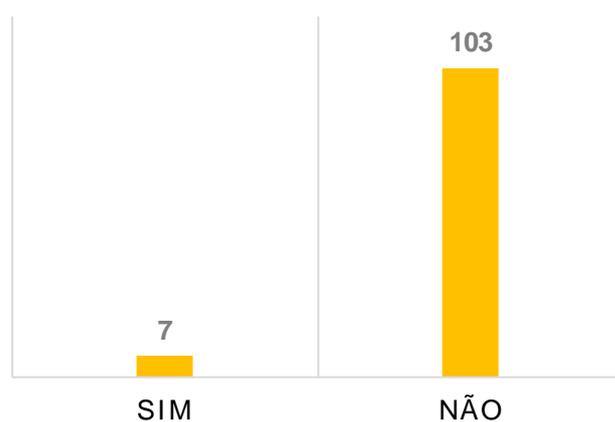


**Figura 15** – Níveis de Ca apresentados pelos animais em decúbito no dia do parto

Verificou-se no presente estudo que, apesar de existir um grande desequilíbrio entre o número de animais que apresentaram decúbito e o número de animais em estação, que a hipocalcemia estava associada com o decúbito ( $P=0,001$ ; Fisher=28,83; Teste Exacto de Fisher). O decúbito corresponde a um sinal clínico característico do 2º e 3º estado da hipocalcemia (Ishler *et al.*, 2010), contudo, deve-se ter presente que o mesmo é comum a

diversas doenças (Radostitis, 2007; Garcia, 2012). No presente trabalho, verificou-se que os 7 animais que apresentaram decúbito (figura 16), responderam positivamente ao tratamento direcionado para a hipocalcemia.

Nos animais em estação, a média da calcemia foi de  $8,13 \pm 0,105$  mg/dL de Ca, enquanto que nos animais em decúbito foi de  $5,90 \pm 0,414$  mg/dL de Ca. Nos animais em estação verificou-se um nível mínimo de 3,89 mg/dL de Ca e um nível máximo de 9,85 mg/dL de Ca. Já nos animais em decúbito verificou-se um nível mínimo de 3,56 mg/dL de Ca e um nível máximo de 7,92 mg/dL de Ca



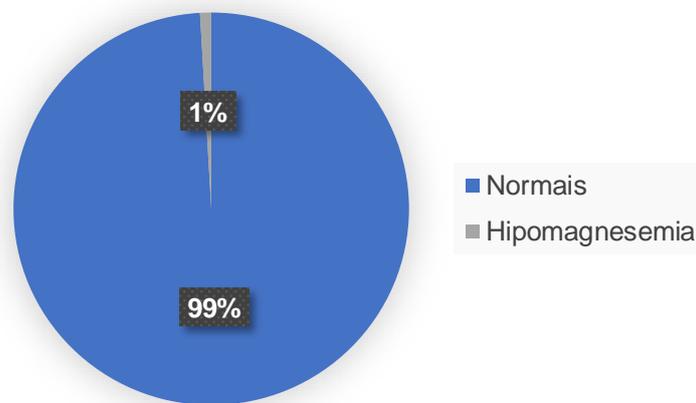
**Figura 16** – Incidência de decúbito

### 6.3. Magnesemia

Uma vez que a capacidade de absorção do Mg proveniente da dieta diminui com a idade (van Mosel *et al.*, 1991; Goff, 2008; Goff, 2014) é de esperar que à medida que os animais vão envelhecendo, a sua capacidade de absorção do Mg seja cada vez menor e como tal, apresentem níveis séricos mais baixos. Assim, seria de esperar que existisse uma associação negativa, com significância estatística, entre os níveis de Mg e a idade. Contudo, os resultados do presente estudo evidenciam que não existiu essa associação estatística entre estas variáveis na amostra em análise ( $P=0,742$ ;  $R^2=0,001$ ; Teste de Tuckey-Kramer). Verificou-se que, animais mais velhos não apresentam níveis mais baixos em Mg como seria o esperado.

Dos 110 animais que constituíram a amostra do presente estudo, 99% (109/110) dos animais apresentaram níveis de Mg acima do limite mínimo considerado como fator de risco para a hipocalcemia (Goff, 2014) sendo que somente um dos animais tinha valores abaixo desse limite.

Na figura 17, verificamos a incidência de hipomagnesemia (valores abaixo de 1,6 mg/dL) nas 110 amostras.



**Figura 17** – Incidência de hipomagnesemia

O único animal que apresentou hipomagnesemia era da exploração F, localizada em Barcelos, e verificou-se que o nível de Ca que o animal apresentou era de 9,02 mg/dL, ou seja, este animal estava normocalcémico. Os níveis baixos de Mg estão geralmente associados a um aumento do risco de desenvolvimento de hipocalcemia (van de Braak *et al.*, 1987; Goff, 2014; Martin-Tereso & Marten, 2014; Neves *et al.*, 2017). Assim, com níveis de Mg abaixo dos 1,6 mg/dL (Sansom *et al.*, 1983; Lean *et al.*, 2006), considera-se que o animal tem um risco acrescido de desenvolver hipocalcemia. No presente estudo, o animal que apresentava hipomagnesemia não tinha hipocalcemia.

Apesar do Mg não estar diretamente relacionado com a etiologia da hipocalcemia, este é um fator predisponente pelo que se torna importante avaliar a situação do efetivo relativamente a este mineral (Thilsing-Hauseu, 2002; Garcia, 2012; Lean *et al.*, 2006; Neves *et al.*, 2017). No presente estudo verificou-se que todas as explorações tinham, em média, níveis controlados deste mineral, ou seja, todas as explorações apresentam níveis de Mg acima do limite mínimo recomendado (1,6 mg/dL).

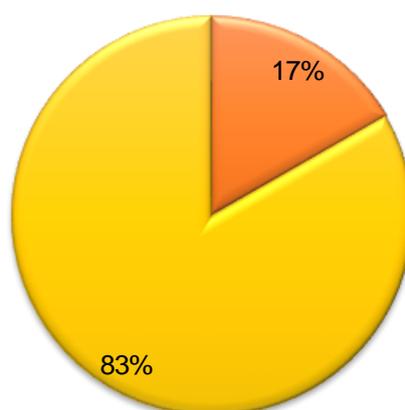
Ao comparar os níveis de Mg dos animais da ilha Terceira e dos animais de Barcelos, verificou-se que os animais da ilha Terceira tinham níveis de Mg superiores. O adubo azotado utilizado quer nas pastagens da ilha Terceira quer nos terrenos agrícolas em Barcelos tem, por defeito, concentrações elevadas em Mg, o que pode conduzir a uma elevada biodisponibilidade do mineral nas dietas fornecidas, que por sua vez aumenta a sua concentração no fluído ruminal, ampliando a sua absorção, contudo, tal hipótese carece de mais estudos.

No presente estudo, verificou-se ainda que os níveis de Ca e os níveis de Mg tinham uma associação negativa ( $P=0,001$ ). Mas uma vez mais tal é consequência de o N ser grande ( $N=110$ ) mas a variabilidade dos valores também, pelo que a qualidade do modelo foi baixa ( $R^2=0,185$ ) condicionando a sua validade (Teste Qui-quadrado). Assim, segundo os resultados do presente estudo, animais que demonstram ter níveis de Mg mais baixo não apresentam níveis de Ca mais baixos comprovando, que neste estudo, o Mg não esteve diretamente relacionado na etiologia da hipocalcemia (Thilsing-Hauseu *et al.*,2002; Goff, 2014).

Verificou-se também que o fator exploração não teve influência nem nos níveis de Ca demonstrados pelos animais no pós-parto imediato ( $P= 0,437$ ;  $R^2 =0,093$ ; Teste Qui-quadrado) assim como nos níveis de magnésio ( $P=0,356$ ,  $R^2= 0,102$ ; Teste Qui-quadrado).

#### 6.4. Doenças Puerperais

Relativamente às doenças puerperais observadas nos primeiros 30 dias pós-parto apenas foi possível realizar a recolha dados em Barcelos. Como tal, os resultados apresentados a seguir são relativos aos 60 animais analisados nas 6 explorações localizadas em Barcelos. Não foram observados casos de prolapsos uterinos nem de deslocamentos de abomaso. No que diz respeito à retenção placentária, dos 60 animais observados, 17% (10/60) desenvolveram retenção placentária e 83% (50/60) não desenvolveram a doença (Figura 18).



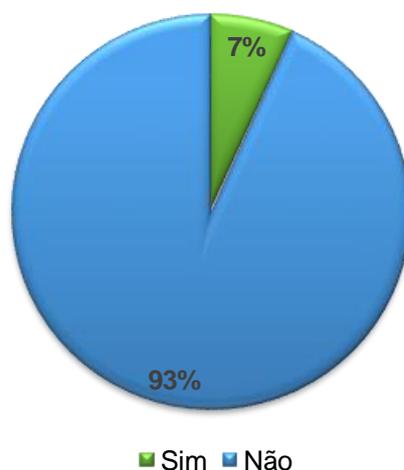
**Figura 18** – Incidência de retenções placentárias em Barcelos

Vários estudos têm demonstrado que vacas com hipocalcemia clínica tem um risco aumentado, até três vezes superior, de desenvolver retenção placentária, quando comparando com vacas normocalcemicas (Houe *et al.*, 2001; Mulligan *et al.*, 2006; Mulligan

*et al.*, 2008; DeGaris and Lean, 2009). No presente estudo, verificou-se que dos 5 animais com HC, apenas 2 desenvolveram retenção placentária. Dos restantes 8 animais que desenvolveram retenção placentária, 2 apresentaram HSC e 6 apresentaram NC.

Apesar de as vacas com HC terem um risco aumentado para desenvolver retenção placentária comparativamente a vacas normocalcemicas (Houe *et al.*, 2001; Mulligan *et al.*, 2006; Mulligan *et al.*, 2008), verificou-se neste estudo que a maioria dos animais que desenvolveram a doença eram animais cujos níveis de Ca eram normais. Tendo em conta os resultados, verificou-se que os níveis de Ca não tiveram influência no desenvolvimento da retenção placentária ( $P= 0,812$ ;  $R^2= 0,817$ ; Teste Qui-quadrado). De notar que, para além da HC, existem outros fatores como sendo uma gestação gemelar, um parto distocico ou a intervenção de agentes infecciosos (Gustafsson *et al.*, 2004; Sheldon *et al.*, 2008) que são também fatores influenciadores na incidência de retenções placentárias e que não foram considerados no presente trabalho.

Os resultados do presente trabalho indicaram que a retenção placentária e a metrite ( $P=0,001$ ) estavam altamente associados nos animais observados, sendo que um animal com retenção placentária tinha 3,7 vezes mais probabilidade de desenvolver metrite (Teste Exacto de Fisher). No entanto temos que ter presente que a validade foi baixa ( $R^2= 0,290$ ). Dos 10 casos de retenção placentária que foram observados, 5 animais desenvolveram metrite. Constatou-se ainda que dos 60 animais observados, apenas 7% (4/60) foram diagnosticados com cetose e os restantes 93% (53/60) não desenvolveram a doença (Figura 19).



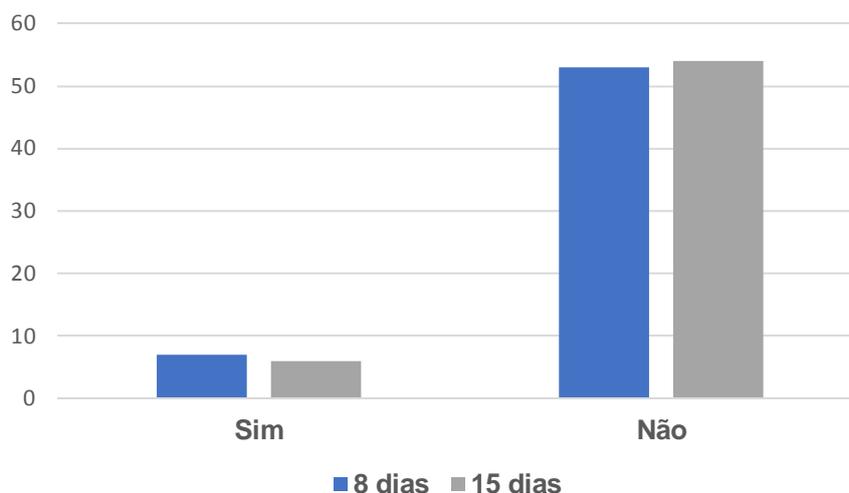
**Figura 19** – Incidência de cetoses em Barcelos

As vacas com HSC têm uma elevada taxa de mobilização de gordura corporal levando a uma elevada concentração de AGNE, aumentando o risco de cetose (Goff, 2014). Assim, animais que tenham níveis de Ca compreendidos entre 5,5 mg/dL e 8 mg/dL são

animais que têm um risco aumentado de desenvolverem cetose. No presente trabalho, verificou-se que não existia associação estatística entre os níveis de Ca e o desenvolvimento de cetose ( $P=0,055$ ; Fisher=3,815). Pode-se, contudo, constatar que os animais que desenvolveram cetose também apresentavam HSC. Provavelmente com uma amostra maior, os resultados seriam estatisticamente significativos, contudo tal carece de mais estudos.

Dos 60 animais observados em Barcelos, 12% (7/60) dos animais desenvolveram metrite aos 8 dias pós-parto enquanto que 88% (53/60) não desenvolveram a doença. Aos 15 dias pós-parto verificou-se que 10% (6/60) dos animais desenvolveram a doença enquanto que 90% (54/60) não.

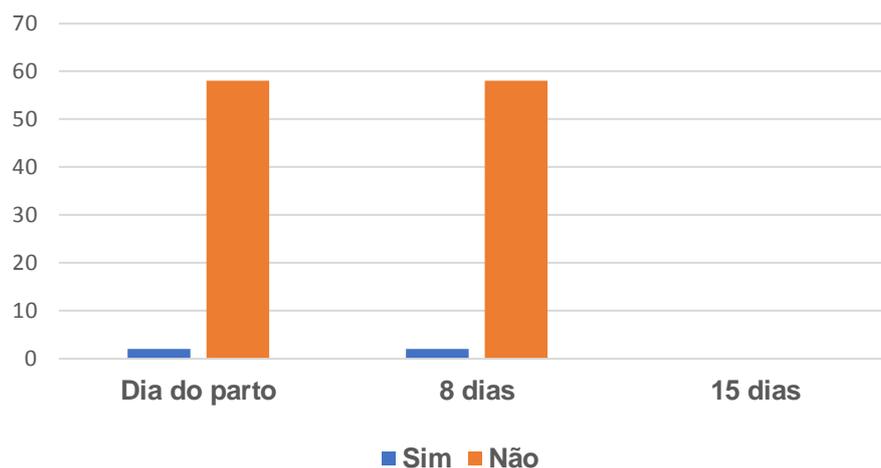
Entre os 8 dias e os 15 dias pós-parto, verificou-se que um animal recuperou (Figura 20), resultando na diminuição da incidência da doença.



**Figura 20** – Animais que desenvolveram metrite aos 8 e 15 dias pós-parto

Em 2012, Martinez *et al.*, afirmaram que a HSC afeta negativamente a função dos neutrófilos e concluíram que o risco de desenvolvimento de metrite aumentava em 22% por cada 1mg/dL de Ca sérico abaixo dos 8,59 mg/dL. No presente trabalho verificou-se que os níveis de Ca não tiveram associação com a metrite ( $P= 0,067$ ; Fisher=3,464; Teste Exacto de Fisher). Contudo, devemos ter presente que dos 60 animais apenas 7 animais desenvolveram a doença, sendo que 2 apresentaram HC e 1 HSC. Os restantes 4 apresentavam níveis de Ca normais.

Dos 60 animais observados verificou-se que, no dia do parto, 3% (2/60) apresentavam mastite assim como aos 8 dias pós-parto (2/60) (Figura 21). Contudo, os 2 animais que aos 8 dias pós-parto apresentavam mastite correspondem, respectivamente, a uma recidiva (o animal já apresentava mastite no dia do parto) e a um novo caso.



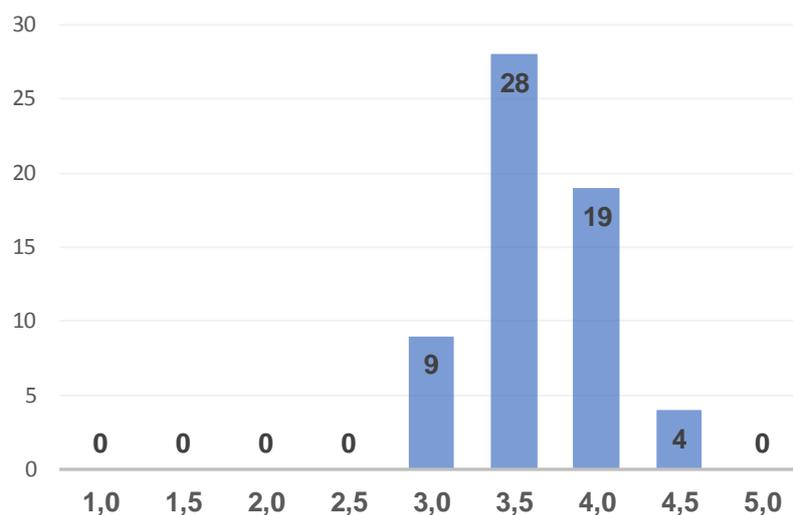
**Figura 21** – Animais que desenvolveram mastite no dia do parto, nos 8 e 15 dias pós-parto

A hipocalcemia, seja clínica ou subclínica, é um fator de risco para várias doenças puerperais, incluindo a mastite (DeGaris and Lean, 2008). Tal deve-se à redução da resposta imunitária que acarreta consigo a diminuição da resposta por parte das células imunitárias a agentes infecciosos externos (Kimura *et al.*, 2006), associado também a uma diminuição da contração do esfíncter mamário (Goff, 2014) facilitando a entrada de agentes infecciosos. No presente trabalho não se obtiveram associações significativas entre os níveis de Ca e o desenvolvimento de mastite. Contudo, deve-se ter presente que, dos animais que desenvolveram a doença, 2 apresentaram HSC e 1 animal, apesar de não ter HSC, tinha níveis de Ca próximos do limite mínimo (8 mg/dL), pelo que eram animais considerados em risco.

### 6.5. Condição corporal

Dos 60 animais observados em Barcelos verificou-se que a maioria dos animais apresentava uma condição corporal que varia entre os 3,5 (28/60) e os 4,0 (19/60) (Figura 22). Neste estudo, verificou-se não existia correlação estatisticamente significativa entre a condição corporal e os níveis de Ca ( $P=0,5407$ ; Fisher=0,3787; Teste Exacto de Fisher).

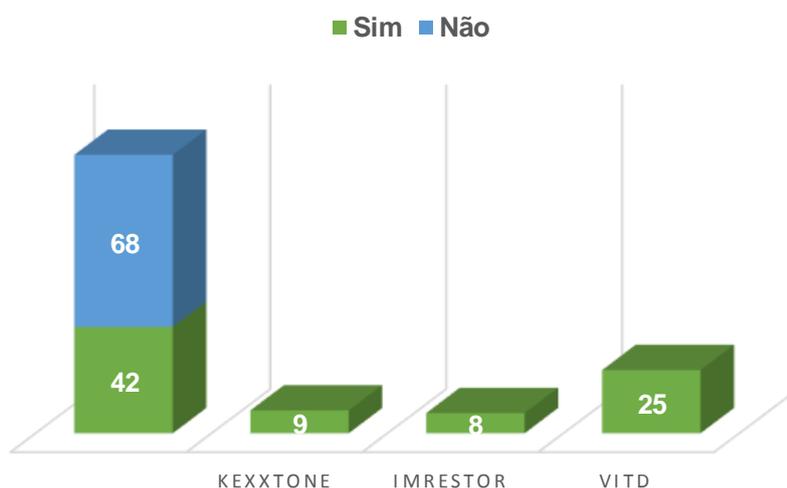
Contudo, existem estudos que defendem que animais com condições corporais exageradas, têm maior probabilidade de sofrer de hipocalcemia, havendo também exarcebação da imunossupressão nos mesmos (Houe *et al.*, 2001). Mulligan *et al.*, num artigo publicado em 2006, referiram que a probabilidade de animais com condições corporais acima do normal desenvolverem HC é 4 vezes superior comparativamente a animais com condições corporais normais. Apesar de, neste trabalho, não ter sido identificada relação estatística entre as variáveis condição corporal e níveis de Ca devemos ter presente a importância do fator condição corporal no período de secagem e no momento do parto.



**Figura 22** – Condição corporal dos animais observados

### 6.6. Tratamentos profiláticos e metafiláticos

Dos 110 animais observados, 42 animais foram tratados pré-parto (Figura 23).



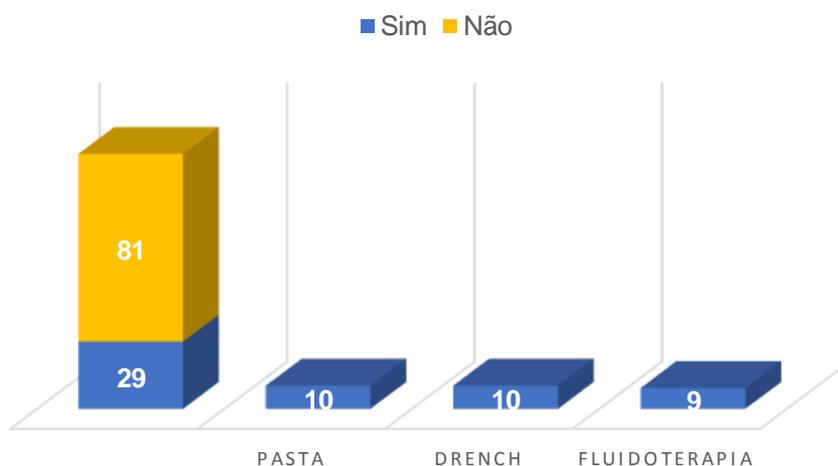
**Figura 23** – Animais expostos a tratamento metabólico pré-parto

Verificou-se que, no presente estudo, não existiu associação ( $P=0,8709$ ; Fisher=0,0266; Teste Exacto de Fisher) entre a administração de tratamento pré-parto e os níveis de Ca. Também não existiu associação entre a administração de imunomoduladores e os níveis de Ca ( $P=0,6447$ ; Fisher=0,2139; Teste Exacto de Fisher). Apesar de apenas ter sido administrado em 8 animais, verificou-se que os animais a que foram administrados imunomoduladores não desenvolveram doenças puerperais nos primeiros 30 dias pós-parto. Seria interessante avaliar a eficácia da sua administração com uma amostragem superior.

A administração da vitamina D3 *ante partum* não teve influência nos níveis de Ca ( $P=0,0736$ ; Fisher=3,265; Teste Exacto de Fisher), sendo que os animais a que foram administrados Vit.D tiveram, em média, níveis de Ca de  $7,62 \text{ mg/dL} \pm 1,17$  ( $N=25$ ) enquanto os animais a que não foi administrada tiveram valores de  $8,11 \pm 1,19 \text{ mg/dL}$  ( $N=85$ ). A administração de doses baixas pode induzir hipocalcemia devido à supressão da PTH e à supressão direta da síntese renal endógena de  $1,25 (\text{OH})_2\text{D}$  (Goff, 2008; Goff, 2014).

Os níveis de suplementação de vitamina D em vacas secas devem estar compreendidos entre as 20 000 e as 35 000 UI (Goff, 2014). A fórmula comercial administrada tinha os níveis compreendidos neste intervalo e foi administrada 3 a 4 dias antes da data prevista de parto. Não foi realizada nenhuma segunda administração da fórmula comercial. A administração de vitamina D permite um aumento das concentrações séricas de  $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$  para níveis que permitam aumentar a absorção intestinal do Ca dietético (Goff, 2014). Contudo, deve-se ter presente que quando a fonte exógena de Vitamina D cessa, os animais podem tornar-se hipocalcémicos dado que o organismo não consegue manter a absorção intestinal de Ca (Lean *et al.*, 2006; DeGaris and Lean, 2008; Goff, 2014; Martin-Tereso & Martens, 2014) o que pode explicar os baixos níveis de Ca observados nos animais a que se administrou vitamina D. Mais uma vez, a eficiência da administração de vitamina D está muito dependente do momento da administração.

Dos 110 animais do presente estudo, 29 foram expostos a tratamento metabólico pós-parto (Figura 24).



**Figura 24** – Animais expostos a tratamento metabólico pós-parto

A administração de *Drench* e pasta oral permite o fornecimento de grandes quantidades de Ca solúvel, de modo a se tirar partido do transporte passivo do Ca (Goff, 2014). O transporte passivo processa-se unicamente pelo gradiente de concentrações: ao

serem fornecidas grandes quantidades de Ca solúvel o gradiente de concentrações será favorável à absorção do mesmo, aumentando a sua concentração sérica (Goff, 2008; Goff, 2014).

Há que ter presente que deveria ter sido feita uma nova colheita de sangue após a administração dos tratamentos metabólicos pós-parto por forma a avaliar-se a sua influência nos níveis de Ca.

Contudo, verificou-se que os animais a que foi administrado *Drench* não desenvolveram nenhuma doença puerperal, sendo que 5 apresentavam HSC e 5 NC no momento do parto. Dos 10 animais a que foi administrada a pasta oral, 1 animal com HC apresentou decúbito e retenção placentária, verificaram-se mais 2 retenções placentárias de animais com HSC que desenvolveram cetose diagnosticada aos 8 dias pós-parto. Os restantes 7 animais, dos quais 2 apresentavam HSC e 5 NC, não desenvolveram nenhuma doença puerperal.

No presente trabalho também se verificou que a administração de fluídos não teve influência nos níveis de Ca ( $P=0,0949$ ; Fisher=2,8391; Teste Exacto de Fisher), mas uma vez mais ter-se-ia que fazer uma nova colheita após a administração dos fluídos de modo a aferir a sua influência. Contudo, verificou-se que no presente estudo, dos 9 animais expostos a fluidoterapia após o parto, apenas se verificou uma retenção placentária sem que esta evoluísse para metrite.

## 7. Comentários Finais

A hipocalcemia continua a ser um tema muito presente na prática clínica do Médico Veterinário ligado à produção leiteira. Devido à sua elevada importância, têm vindo ao longo do tempo, a serem discutidas na comunidade científica a sua etiologia e as medidas preventivas que podem ser desenvolvidas de modo a minimizar as suas consequências e a própria incidência da mesma. Tendo em conta o contexto económico que a produção leiteira nacional atravessa e sendo a hipocalcemia uma doença que acarreta consigo prejuízos produtivos e económicos relevantes, torna-se cada vez mais importante a elaboração de um plano profilático com medidas eficazes.

O presente trabalho vem corroborar, de uma forma geral, o que já tem sido descrito pela comunidade científica: animais com mais idade, com mais lactações, que apresentem decúbito são animais que tem uma maior dificuldade em manter a homeostasia do cálcio sendo por isso animais que devemos considerar como animais em risco de desenvolverem hipocalcemia e que merecem a nossa especial atenção. Apesar dos níveis de magnésio não terem influenciado os níveis de cálcio demonstrados pelos animais no presente trabalho devemos ter sempre presente que este, embora não seja causa etiológica, é um fator de risco para o desenvolvimento da hipocalcemia, cetose e mastite.

Os resultados obtidos sugerem que se deve começar a dar atenção aos animais primíparos, animais estes que são considerados como tendo baixo risco de hipocalcemia. A incidência de 9% de hipocalcemia subclínica em animais primíparos alerta-nos para a sua situação de risco face às doenças puerperais, como por exemplo, a retenção placentária.

Devem ser realizadas intervenções junto dos produtores, alertando-os para os prejuízos económicos da hipocalcemia assim como também para as consequências nefastas que esta tem na qualidade de vida e bem-estar dos animais. Existem produtores que já vão desenvolvendo algumas medidas preventivas como a administração de vitamina D antes do parto, ou a administração de *Drench* ou pastas orais. No presente estudo a administração de vitamina D pré-parto não demonstrou influência sobre os níveis de cálcio, aliás, os animais a que foi administrada a vitamina D apresentaram, em média, níveis mais baixos de cálcio. Será importante avaliar se a administração desta está a ser realizada atempadamente, uma administração muito desfasada do momento do parto pode levar à indução de níveis mais baixos de cálcio podendo induzir a hipocalcemia.

Embora os resultados do presente estudo, não tenham apontado para que o fator exploração influencie estatisticamente os níveis de Ca, verifica-se uma grande variabilidade entre as explorações, assim seria importante o produtor avaliar a incidência de hipocalcemia na sua exploração por forma a melhor desenvolver um plano profilático.



## 8. Referências bibliográficas

- Amicis, I. D, Veronesi, M. C, Robbe, D, Gloria, A, (2017). Prevalence, causes and consequences of bovine in Italy. *Theriogenology*. Volume 107, pp. 104-108
- Arsenos, G, Christaki, E, Karatzias, E, (2005). Effects of Long-Term Dietary Supplementation with Clinoptilolite on Incidence of Parturient Paresis and Serum Concentrations of Total Calcium, Phosphate, Magnesium, Potassium, and Sodium in Dairy Cows. *American Journal of Veterinary Research*, 66: 2081–2085.
- Banks, W.J, (1986). Supportive tissue Bone. *Applied Veterinary Histology*. Second Edition, Chapter 9, pp. 468-469.
- Bhanugopan, M. S, Fulkerson, W. J, Fraser, D. R, Hyde, M, & Mcneill, D. M. (2010). Carryover effects of potassium supplementation on calcium homeostasis in dairy cows at parturition. *Journal of Dairy Science*, 93:2119–2129.
- Braun, U, Jehle, W. (2007). The effect of intravenous magnesium hypophosphite in calcium solution on the serum concentration of inorganic phosphorus in healthy cows. *The Veterinary Journal*, 173: 379-383.
- Correa, M. T, Erb, H, Scarlett, J. (1993) Path Analysis for Seven Postpartum Disorders of Holstein Cows. *Journal of Dairy Science* 76: 1305–1312.
- Cunningham, J.G. (2007). Endocrine Glands and Their Function. In *Textbook of Veterinary Physiology*. Second Editon. (pp 432-438). Saunders Company.
- Curtis, C.R, H.N. Erb, C.J. Sniffen, R.D. Smith, P.A. Powers, M. C.Smith, M.E. White, R. B. Hillman, and E.J. Pearson. (1993). Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183: 559-561.
- DeGaris, J.P, & Lean, I.J, (2009). Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles. *The Veterinary Journal*, 176: 58-59.

- Divers, T. J, & Peek, S. F. (2008). Metabolic Diseases. In *Disease of Dairy Cattle* (pp. 590-603). Saunders Elsevier.
- Doll, K, Sickinger, M, & Seeger, T. (2009). New aspects in the pathogenesis of abomasal displacement. *The Veterinary Journal*, 181: 90-96.
- Doll, Klaus. (2015). Abomasal Displacement in Dairy Cattle: A Hereditary Disease?. *The Veterinary Journal*: 7–8.
- Erb, H N, and Y T Grohn. 1988. "Epidemiology of Metabolic Disorders in the Periparturient Dairy Cow." *Journal of Dairy Science* 71(9): 2557–71.
- Garcia, P. M. P. (2012). Monitorização e Avaliação do Risco de Hipocalcémia Subclínica em oito explorações da ilha Terceira, Açores. Universidade de Évora. 1-108
- Goff, J. P. (2008) And Subclinical Hypocalcemia in Dairy Cows. *The Veterinary Journal* 176(1): 50–57.
- Goff, J. P. (2007). Effect of Application of Ammonium Chloride and Calcium Chloride on Alfalfa Cation-Anion Content and Yield. *Journal of Dairy Science* 90(11): 5159–64.
- Goff, J. P. (2014). Calcium and Magnesium disorders. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 30(2): 359–81.
- Goff, J.P. (2006). Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders, *Animal Feed Science and Technology*, 126: 237-257.
- Goff, J.P. (2004). Mineral disorders of the transition cow. *Veterinary Clinics Food Animal*, 20: 471-494.
- Goff, J. P. (2000). Pathophysiology of Calcium and Phosphorus Disorders. *USDA*, 1-16.
- Goff, J. P. (2008). The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *The Veterinary Journal*, 156: 50-57.

- Goff, J.P, Horst, R. L. (2003). Acid-Base Physiology on the Pathogenesis of Parturient Hypocalcemia (Milk Fever) – the DCAD Theory in Principle and Practice. *Acte vet. Scand*, 97: 51-56.
- Goff, J.P, Horst, R.L (1993). Calcium Salts for treating Hypocalcemia: Carrier Effects, Acid-Base Balance, and Oral Versus Rectal Administration. *Journal of Dairy Science*, 77: 1451-1456.
- Goff, J.P, Horst, R.L (1997). Effects of the addition of Potassium or Sodium, but not Calcium, to Prepartum Rations on Milk Fever in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 80: 176-186.
- Goff, J. P, Reinardt, T. A, & Horst, R. L. (1990). Enzymes and factors controlling vitamin D metabolism and action in normal and milk fever cows. *Journal of Dairy Science*, 74: 4022-4032.
- Goff, J. P, Koszewski, N.J. (2018). Comparison of 0.46 % Calcium Diets with and without Added Anions with a 0.7 % Calcium Anionic Diet as a Means to Reduce Periparturient Hypocalcemia. *Journal of Dairy Science*: 1–13.
- Guyton, A. C, & Hall, J. E. (2000). Parathyroid hormone, calcitonin, calcium and phosphate metabolism, vitamin D, bone, and teeth. *In Medical Physiology, Tenth edition* (pp.899-915). USA: W.B. Saunders Company.
- Houe, H, Ostergaard, S, Thilsing-Hansen, T, Jorgensen, R.J, Larsen, J.T, Sorensen, J.T, Agger, J.F, Blom, J.Y. (2001). An evaluation of parameters on incidence risk, diagnosis, risk factors and biological effects as input for a decision support system for disease control. *Acta vet. Scand.* 42: 3-27.
- Houe, H, Ostergaard, S, Thilsing-Hansen, T, Jorgensen, R.J, Larsen, J.T, Sorensen, J.T, Agger, J.F, Blom, J.Y. (2001). An evaluation of parameters on incidence risk, diagnosis, risk factors and biological effects as input for a decision support system for disease control. *Acta vet. Scand.* 42: 3-27.

- Hu, W, Murphy, R. (2004). Dietary Cation-Anion Difference Effects on Performance and Acid-Base Status of Lactating Dairy Cows: A Meta- Analysis. *Journal of Dairy Science*, 87: 2222-2229.
- Jawor, P.E, Huzzey, J.M, Leblanc, S.J, von Keyserlingk, M.A.G, (2012). Associations of subclinical hypocalcemia at calving with milk yield, and feeding, drinking, and standing behaviors around parturition in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 95: 1240-1248.
- Kahn, M.C, Line, S, Allen, D.G, Anderson, D.P, Jeffcott, L.B, Quensenberry, K.E, Radostits, O.M, Reeves, P.T, Wolf, A.M. (2005). Problematic Bovine Recumbency. *The Merck Veterinary Manual. Ninth Edition*. pp. 957-961.
- Kara, Ç, Orman, A, Udum, D, Yavuz, H. M, & Kovanlıkaya, A. (2009). Effects of calcium propionate by different numbers of applications in first week postpartum of dairy cows on hypocalcemia, milk production and reproductive disorders. *Italian Journal of Animal Science* 8: 259-270.
- Kimura, K, Goff, J.P, Kehril, E.M.E (2002). Decreased Neutrophil as a Cause of Retained Placenta in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*. 85: 544-550.
- Kimura, K, Reinhardt, T.A, Goff, J.P (2006). Parturition and Hypocalcemia Blunts Calcium Signals in Immune Cells of Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 89: 2588-2595.
- Larsen, T, G Møller, and R Bellio. (2001). Evaluation of Clinical and Clinical Chemical Parameters in Periparturient Cows. *Journal of Dairy Science* 84(7): 1749–58.
- Lean, I.J, DeGaris, P.J, McNeil, D.M. & Block, E. (2006). Hypocalcemia in Dairy cows: Meta-analysis and Dietary Cation Anion Difference Theory Revisited. *Journal of Dairy Science*, 89: 669-684.
- LeBlanc, S. J, Duffield, T. F, Leslie, K. E, Bateman, K. G, Keefe, G. J, Walton, J. S, Johnson, W.H. (2002). The effect of Treatment of Clinical Endometritis on Reproductive Performance in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 85: 2237- 2249.

- Leno, B.M, Neves, R.C, Louge, M.I, Curler, M.D, Thomas, M.J, Overton, T.R, McArt, A.A.J. (2018). Differential Effects of a Single Dose of Oral Calcium Based on Postpartum Plasma Calcium Concentration in Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*: 1–18.
- Martinez, N, Rodney, R.M, Block, E, Hernandez, L.L, Nelson, C.D, Lean, I.J, Santos, J.E.P. (2018). Effects of Prepartum Dietary Cation-Anion Difference and Source of Vitamin D in Dairy Cows: Health and Reproductive Responses. *Journal of Dairy Science*: 1–16.
- Martin-Tereso, J, Martens, H. (2014) Calcium and Magnesium Physiology and Nutrition in Relation to the Prevention of Milk Fever and Tetany (Dietary Management of Macrominerals in Preventing Disease). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*: 643-670
- Mccarthy, M.M, Mann, S, Nydam, D.V, Overtom, T.R, McArt, A.A.J. (2015). Short Communication: Concentrations of Non-esterified Fatty Acids and  $\beta$ -Hydroxybutyrate in Dairy Cows Are Not Well Correlated during the Transition Period. *Journal of Dairy Science*: 1–7
- Mcculloch, C. E, Gröhn, Y.T, Rajala- Schultz, P.J, (1999). Effects of Milk Fever, Ketosis, and Lameness on Milk Yield in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*: 288–294.
- Mulligan, F, O'Grady, L, Rice, D, & Doherty, M. (2006). Production disease of the transition cow: Milk fever and subclinical hypocalcemia. *Irish Veterinary Journal*, 59: 12.
- Mulligan, F J, and M L Doherty. (2008). Production Diseases of the Transition Cow. *The Veterinary Journal* 176(1): 3–9.
- Mundy, G. R. & Guise, T. A, (1999). Hormonal Control of Calcium Homeostasis. *Clinical Chemistry*, 45: 1347-1352.
- Neves, R. C, Leno, B. M, Stokol, T, Overton, T. R, McArt, A. A. J. (2017). Risk factors associated with postpartum subclinical Hypocalcemia in Dairy Cows." *Journal of Dairy Science*: 1–9.

- Newton, C. D, & Nunamaker, D. M. (1985). Calcium-Regulating Hormones and Metabolic Bone Disease. *Textbook of Small Animal Orthopedics, Cap. 42*, 1-17.
- Noakes, D.E, Parkinson, T.J, England, G.C.W. (2009). Subfertility and Infertility. In *Veterinary Reproduction and Obstetrics. Ninth Edition*. Chapter 22. (pp. 439-442). Saunders Elsevier.
- Oetzel, G.R. (2004) Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 20: 651-674.
- Oetzel, G, Goff, J.P. (2009) Milk Fever (Parturition Paresis) in Cows, Ewes, and Doe Goats. In *Food Animals Practice, Fifth Edition*. Anderson, D.E, Rings, D.M.Saunders Elsevier. (pp 130-134).
- Oetzel, G, Miller, B. (2012). Effect of Oral Calcium Bolus Supplementation on Early-Lactation Health and Milk Yield in Commercial Dairy Herds. *Journal of Dairy Science* 95(12): 7051–65.
- Ortega, B, MacWilliams, J.R, Dey, J.M, Courtright, V.B. (2015). Hyperphosphatemia, hypocalcemia and increased serum potassium concentration as distinctive features of early hypomagnesemia in magnesium-deprived mice. *Magnes Res* 2015; 28(4): 126-35
- Overton, T R, J A A Mcart, and D V Nydam. (2017). “A 100-Year Review: Metabolic Health Indicators and Management of Dairy Cattle 1.” *Journal of Dairy Science* 100(12): 10398–417.
- Overton, T. R, Mcart, J. A. A, Nydam. D. V. (2017). A 100-Year Review: Metabolic Health Indicators and Management of Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* 100(12): 10398–417.
- Paudyal, S, Maunsell, F. R, Richeson, J. T, Risco, C. A, Donovan, D. A, Pinedo, P. J. (2017). Ruminant Time and Monitoring of Health Disorders during Early Lactation. *The Animal Consortium* 2017: 1–9.

- Radostits, O. M, Gay, O. M, Hinchcliff, K. W, & Constable, P. D. (2007). Metabolic diseases. In *Veterinary Medicine, Tenth edition* (pp. 1613-1688). Edinburg: Saunders Elsevier.
- Reinhardt, T. A, Lippolis, J. D, McCluskey, B. J, Goff, J.P, Horst, R. L. (2011). Prevalence of Subclinical Hypocalcemia in Dairy Herds. *The Veterinary Journal* 188(1): 122–24.
- Rérat, M, Philipp, A, Hess, H. D, & Liesegang, A. (2009). Effect of different potassium levels in hay on acid–base status and mineral balance in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92: 6123–6133.
- Riond, J.L, (2001). Animal Nutrition and acid-base balance, *European Journal of Nutrition*, 40: 245- 254.
- Roche, J.R, Friggens, N.C, Kay, J.K, Fisher, M.W, Stafford, K.J, Berry, D.P. (2009). *Journal of Dairy Science*, 92: 5769-5801.
- Roche, J. R, Heiser, A, Mitchell, M. D, Crookender, M. A, Walker, C. G, Kay, J. K, Riboni, M. V, Loor, J. J, Meier, S. (2017). Strategies to Gain Body Condition Score in Pasture-Based Dairy Cows during Late Lactation and the Far-off Nonlactating Period and Their Interaction with Close-up Dry Matter Intake. *Journal of Dairy Science*: 1–19.
- Roche, J. R, Meier, S, Heiser, A, Mitchell, M. D, Walker, C. G, Crookenden, M. A, Riboni, M. V, Loor, J. J, Kay, J. K. (2015). Effects of Precalving Body Condition Score and Prepartum Feeding Level on Production, Reproduction, and Health Parameters in Pasture-Based Transition Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*: 1–19.
- Roche, J. F. (2006). The Effect of Nutritional Management of the Dairy Cow on Reproductive Efficiency. *Animal Reproduction Science* 96: 282–96.
- Rodríguez, E. M, Arís, A, Bach, A. (2017). Associations between Subclinical Hypocalcemia and Postparturient Diseases in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 100: 1–8.
- Ruprechter, G, Adrien, M. D. L, Meotti, O, Batista, C, Meikle, A. (2018). Metabolic predictors of peri-partum diseases and their association with parity in dairy cows. *Research in Veterinary Science*.

- Sánchez, J. (2017). Risk Factors Associated with Milk Fever Occurrence in Grazing Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*: 1–8.
- Seifi, H. A, LeBlanc, S. J, Leslie, K. E, Duffield, T. F. (2011). Metabolic predictors of postpartum disease and culling risk in dairy cattle. *The Veterinary Journal*, 188: 216- 220
- Seifi, H.A, Mohri, M, & Kalamati Zadeh, J. (2004). Use of pre-partum urine pH to predict the risk of milk fever in dairy cows. *The Veterinary Journal*, 167: 281-285.
- Sheldon, I. M, Lewis, G. S, LeBlanc, S, Gilbert, R. O. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, 65: 1516-1530.
- Smith, B. P. (2007). Metabolic disorders. In *Large Animal Internal Medicine, Fourth edition* (pp.1369-1373). United States of America: Mosby Elsevier.
- Smith, J.B, Berger, L.L, Ferrel, C, Fox, D.G, Galyean, M, Hutchseon, D.P, Klopfenstein, T.J, Spears, J. (2000). *Nutrient Requirements of Beef Cattle, Seventh Edition* (pp, 54-74).
- Spo, R, Kronqvist, C, Emanuelson, U, Tra, M, Holtenius, K. (2012). Relationship between Incidence of Milk Fever and Feeding of Minerals during the Last 3 Weeks of Gestation. *The animal consortium 2012*: 1316–21.
- Steiner, A. (2006). Surgical treatment of the left displacement of the abomasum. *World Buiatrics Congress*, (pp. 1-5). Nice, France.
- Street, B. (1989). The evaluation of a routine treatment with 1<sup>a</sup>-Hydroxyvitamin D3 for the prevention of Bovine parturient paresis. *Preventive Veterinary Medicine 7*: 1-9 Elsevier Science
- Taylor, M, Knowlton, K, McGilliard, M, Seymour, W. M, & Herbein, J. H. (2008). Blood Mineral, Hormone, and Osteocalcin Responses of Multiparous Jersey Cows to an Oral Dose of 25-Hydroxyvitamin D3 or Vitamin D3 Before Parturition. *Journal of Dairy Science*, 91: 2408 -2416.

- Tatone, E. H, Gordon, J. L, Leblanc, S. J, Duffield, T. F. (2015). Of Developing Postpartum Hyperketonemia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*: 246(10): 6–11.
- Thilsing-Hansen, T, Jørgensen, R, & Østergaard, S. (2002). Milk Fever Control Principles: A Review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43: 1-19.
- Venjakob, P. L, Borchardt, B, Heuwieser, W. (2017). Hypocalcemia — Cow-Level Prevalence and Preventive Strategies in German Dairy Herds. *Journal of Dairy Science* 100: 1–9.
- Weiss, W. P, Azem, E, Steinberg, W, Reinhardt, T. A. (2015). Effect of Feeding 25-Hydroxyvitamin D 3 with a Negative Cation-Anion Difference Diet on Calcium and Vitamin D Status of Periparturient Cows and Their Calves. *Journal of Dairy Science* 98: 1–13.
- Wilhelm, A. L, Maquivar, M. G, Bas, S, Brick, T. A, Weiss, W. P, Bothe, H, Velez, J. S. (2017). Effect of Serum Calcium Status at Calving on Survival, Health, and Performance of Postpartum Holstein Cows and Calves under Certified Organic Management. *Journal of Dairy Science* 100: 1–9.
- Whiteford, L.C, Sheldon, I.M (2005). Association between hypocalcemia and postpartum endometritis. *The Veterinary Records*, 157: 202-204.
- Wu, Z, Bernard, J. K, Zanzalari, K. P, Chapman, J, D. (2014). Effect of Feeding a Negative Dietary Cation-Anion Difference Diet for an Extended Time Prepartum on Postpartum Serum and Urine Metabolites and Performance. *Journal of Dairy Science* 97: 7133–7143.
- Wu, W, Liu, J, Xu, G, & Ye, J. (2008). Calcium homeostasis, acid–base balance, and health status in periparturient Holstein cows fed diets with low cation–anion difference. *Livestock Science*, 117: 7-14.
- Zadnik, T, Soršak, B, Martina, K, & Starič, J. (2008). Duphafrol® Vit. D3 1000 and Katan ® Anionic Salts for the Prevention of Milk fever in Dairy Cows. *Acta Veterinaria (Belgrad)*, 58: 241-257.