

VASCO RODRIGUES JARA FRANCO

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CÁLCIO
ORAL NO PÓS-PARTO COMO MÉTODO DE
PREVENÇÃO DE HIPOCALCÉMIA.**

Orientador: Professor Doutor João Ribeiro Lima

Coorientador: Dr. João Guilherme dos Santos Paisana

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2016

VASCO RODRIGUES JARA FRANCO

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CÁLCIO
ORAL NO PÓS-PARTO COMO MÉTODO DE
PREVENÇÃO DE HIPOCALCÉMIA.**

**Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de
Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado
Integrado em Medicina Veterinária conferido pela
Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Presidente do Júri: Professora Doutora Laurentina Pedroso
Arguente: Professor Doutor Carlos Bettencourt
Orientador: Professor Doutor João Ribeiro Lima
Coorientador: Dr. João Guilherme dos Santos Paisana**

Defesa ocorreu dia 4 de novembro de 2016

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2016

Agradecimentos

Ao Crescer moldamo-nos e adaptamo-nos a um Mundo e a toda uma conjuntura que sem nos apercebermos nos transforma e nos mostra quem realmente somos, as nossas forças, fraquezas, os nossos limites. Nunca paramos realmente de crescer. Nas diferentes etapas, deparamo-nos com diferentes situações, pessoas, que alteram de alguma forma a nossa perspetiva, sendo que no mínimo a torna mais ampla. Todas as experiências, por mais insignificantes que possam parecer, têm influência.

Desta forma queria agradecer aos que me acompanham desde sempre, aos que só entraram nesta última etapa e a todos que de alguma forma tiveram impacto no meu percurso e que me trouxe até aqui.

Gostaria também de agradecer à Vetlima pelo apoio no estudo assim como ao Dr. João Paisana, ao Dr. Pedro Lima e ao Professor Doutor João Lima por todo o apoio neste percurso.

Aos meus pais, ao meu irmão, à minha família, aos meus amigos, aos meus professores.

À Mariana.

Obrigado.

Resumo

O período de transição é um período crítico para a vaca de leite e uma das razões é o teste aos mecanismos de homeostasia dos níveis de cálcio, que têm de competir com a necessidade de cálcio para a lactação, nomeadamente o colostro, rico em cálcio. Estas alterações nos níveis de cálcio têm também consequências fisiológicas e clínicas, levando a enormes perdas económicas.

Como prevenção existem vários protocolos utilizados, o protocolo avaliado neste estudo foi a administração peri-parto de dois bolus de cálcio oral Bovikalc®.

O objetivo do estudo era determinar o efeito da administração de cálcio oral após o parto nos valores serológicos de cálcio medindo-os, sendo as amostras recolhidas logo após o parto e passadas 24 horas, de forma a verificar a concordância com os valores estipulados na bibliografia. Correlacionar também esses valores com a ocorrência de outras alterações como alterações na média de produção, cetose, metrite e mastite de forma a avaliar a sua influência, comparando-os com a bibliografia existente e entre os dois grupos.

A população (n=41) em estudo provinha de uma exploração no Ribatejo, ocorrendo no período de 16 de junho de 2015 a 31 de outubro de 2015. Foram divididos em dois grupos o grupo de controlo (n=21), na qual as amostras foram recolhidas logo após o parto e passadas 24 horas e foi apenas administrado um frasco de 500 ml intravenoso de cálcio imediatamente após o parto, depois da colheita da primeira amostra, protocolo aplicado na exploração. No grupo de tratamento (n=20) as amostras foram recolhidas também logo após o parto e passadas 24 horas, mas foi administrado após a primeira colheita de amostra um frasco de 500 ml de cálcio intravenoso e dois bolus de cálcio oral Bovikalc®.

Devido ao tamanho da amostra não foi possível obter conclusões quanto à diferença entre grupos, embora tenha sido possível verificar que no grupo de controlo, ocorreu uma descida acentuada dos níveis de cálcio ao contrário do grupo de tratamento, a média dos valores de cálcio observados no grupo de tratamento desceram de 6,66 mg/dL na primeira amostra para 6,63 mg/dL na segunda amostra, já no de controlo desceu de 7,07 mg/dL na primeira amostra para 6,62 mg/dL na segunda amostra. Foi também possível ter uma ideia do panorama atual da exploração no que respeita os níveis de cálcio. Relativamente às alterações secundárias consequentes dos níveis baixos de cálcio, não foi possível a comparação entre grupos, devido à pouca diferença existente entre os níveis de cálcio dos mesmos e ao tamanho da amostra, sendo também apenas possível analisar a situação atual da exploração, em que se

observou hipocalcemia clínica em 7,3%, mastite em 51,2%, metrite em 12,2% e cetose em 4,9% das vacas em estudo. Encontrando-se os casos de metrite e cetose abaixo dos valores estipulados, ao contrário dos casos de hipocalcemia clínica e mastite.

Palavras-chave: Cálcio, Período de Transição, Hipocalcemia, Vacas de leite.

Abstract

The transition period it's a critical period for the dairy cow, and one of the reasons is the test to their calcium level homeostatic mechanisms, that have to compete with the necessity of calcium for the lactation, namely the colostrum, which is rich in calcium.

These changes in calcium levels also have physiological and clinical consequences, leading to huge economic losses.

For prevention, there are many protocols used, the protocol used in this study was the administration peripartum of two bolus of oral calcium Bovikalc®.

The objective of this study was to determine the effect of the oral calcium administration after parturition in the serological values, measuring them, collected soon after parturition and 24 hours after and verifying their concordance with the values stipulated by the literature. Also correlate those values with the occurrence of other changes, as changes in mean production, ketosis, metritis and mastitis, evaluating their influence, comparing them with the existing literature and between the two groups.

The population (n=41) in study came from a dairy in Ribatejo, during the period between June 16th and October 31th of 2015. They were divided in two groups, the control group (n=21), in which the samples were collected soon after parturition and another one 24 hours past that, but soon after the first sample was collected it was administered a bottle of 500ml of intravenous calcium. In the study group (n=20) the samples were also collected soon after parturition and after 24 hours, but it was administered a bottle of 500 ml of intravenous calcium and two bolus of oral calcium Bovikalc® soon after the first sample was collected.

Due to the sample size it wasn't possible to draw conclusions as to the difference between the two groups, although it was possible to verify that in the control group there was a sharp drop in calcium levels, unlike the study group, the observed mean of the calcium values in the study group fell from 6,66 mg/dL in the first sample to 6,63 mg/dL in the second sample, in the control group they fell from 7,07 mg/dL in the first sample to 6,62 mg/dL in the second sample. It was also possible to get an idea of the current state of the dairy, as regards the calcium levels. Relatively to the secondary alterations due to the low levels of calcium, it wasn't possible to compare the two groups, due to the size of the sample and the few variations between groups, it was also only possible to analyse the current state of the dairy.

Keywords: Calcium, Transition Period, Hypocalcaemia, Dairy cows.

Abreviaturas, siglas e símbolos

1,25(OH)₂D – 1,25-dihidroxivitamina D

AMP – Adenosina Monofosfato

ATP – Adenosina Trifosfato

Ca – Cálcio

Caⁱ – Cálcio Ionizado

Cl⁻ – Cloro

DCAD – Diferença catião-anião na dieta

dl – Decilitros

g – Grama

GDP – Guanosina Difosfato

GTP – Guanosina Trifosfato

HPT – Hormona Paratiroide

IC_{95%} – Intervalo de Confiança

K⁺ – Potássio

kg – Quilograma

L – Litro

M-CSF – Colônia de Macrófagos

mmol – Milimole

mg – Miligrama

Mg²⁺ – Magnésio

Na⁺ – Sódio

nm – Nanómetro

PO₄³⁻ – Fosfato

RVD – Recetor de vitamina D

SO₄²⁻ – Sulfato

TCM – Teste Californiano de Mastite

TRPV6 – *‘Transiente receptor potential cation channel subfamily V’*

% – Percentagem

® - Marca Registada

Índice Geral

Agradecimentos	2
Resumo	3
Abstract.....	5
Abreviaturas, siglas e símbolos	6
Índice Geral	8
Índice de Anexos	11
Índice de Figuras	11
Introdução.....	13
Capítulo I – Relatório do Estágio	15
Capítulo II – Enquadramento Teórico-Conceptual	19
2.1 Contextualização.....	20
2.2 Fisiologia do Cálcio	20
2.2.1 Formas de Cálcio.....	21
2.2.2 Hipocalcémia.....	21
2.2.3 Mecanismos de controlo dos níveis de cálcio em Hipocalcémia	22
2.2.3.1 Papel da Hormona da Paratiroide (HPT).....	22
2.2.3.1.1 <i>Reabsorção Renal de cálcio</i>	23
2.2.3.1.2 <i>Reabsorção óssea de cálcio pelos osteoclastos</i>	24
2.2.3.1.3 <i>Osteólise osteocítica do cálcio dos ossos</i>	25
2.2.3.1.4 <i>Absorção de cálcio na dieta</i>	26
2.2.3.1.5 <i>Vitamina D</i>	26
2.2.3.1.6 <i>Absorção transcelular intestinal dependente de vitamina D</i>	27
2.2.3.1.7 <i>Absorção paracelular intestinal de cálcio</i>	28
2.3 Etiologia da Hipocalcémia.....	29
2.3.1 Fatores Metabólicos	29
2.3.1.1 Alcalose metabólica.....	29
2.3.1.2 Hipomagnesiémia	29
2.3.2 Outros Fatores	31
2.3.2.1 Idade	31
2.3.2.2 Raça	32
2.3.2.3 Condição Corporal.....	32

2.4 Incidência.....	32
2.4.1 No Mundo	32
2.4.2 Em Portugal.....	33
2.5 Sinais Clínicos	33
2.6 Diagnóstico Clínico	33
2.7 Tratamento	34
2.7.1 Cálcio Intravenoso.....	34
2.7.2 Suplementação oral de cálcio	35
2.7.3 Formas de cálcio oral	35
2.7.4 Cálcio Subcutâneo e Intramuscular.....	37
2.7.5 Naloxona	38
2.8 Prevenção.....	38
2.8.1 Dietas pobres em cálcio.....	39
2.8.2 Dieta com baixa diferença entre catiões-aniões	39
2.8.2.1 Monitorizar o pH da urina	40
2.8.3 Administração de cálcio oral perto do parto	40
2.8.4 Administração de Vitamina D, os seus metabolitos e análogos no pré-parto	41
2.8.5 Outros princípios de controlo	42
2.9 Consequências da Hipocalcémia.....	42
2.9.1 Consequências Fisiológicas.....	42
2.9.2 Consequências Clínicas.....	43
2.9.2.1 Distocia e Prolapso Uterino	43
2.9.2.2 Retenção de Placenta	43
2.9.2.3 Endometrite	43
2.9.2.4 Fertilidade	43
2.9.2.5 Mastite	44
2.9.2.6 Função do trato gastrointestinal.....	44
2.10 Impacto económico.....	45
Capítulo III – Materiais e Métodos.....	47
3.1 Tipo de estudo.....	48
3.2 Questão de investigação.....	48
3.3 Objetivos	48
3.4 Contexto do estudo	48

3.4.1 Exploração e período de estudo	48
3.4.2 Amostra	48
3.4.2.1 Critérios de inclusão	49
3.4.2.2 Caracterização da amostra	49
3.5 Desenho experimental.....	49
3.6 Recolha e tratamento das amostras	50
3.7 Análise estatística	50
Capítulo IV – Resultados.....	52
4.1 Resultados relativos às questões de investigação	53
4.1.1 Avaliação do efeito da administração oral de Ca, logo após o parto, nos níveis séricos de Ca.....	53
4.1.2 Avaliação da relação dos níveis de Ca com a ocorrência de hipocalcémia clínica, assim como de alterações no pós-parto dependentes desses mesmos níveis.	56
Capítulo V - Discussão	60
5.1 Respostas às questões de investigação.....	61
5.1.1 Avaliação do efeito da administração oral de Ca, logo após o parto, nos níveis séricos de Ca.....	61
5.1.2 Avaliação da relação dos níveis de Ca com a ocorrência de hipocalcémia clínica, assim como de alterações no pós-parto dependentes desses mesmos níveis.	62
5.1.3 Situações que dificultaram o estudo.....	64
5.1.4 Alternativas ao estudo e outros estudos pertinentes.....	64
Conclusão	65
Referências Bibliográficas.....	66
Anexos.....	76

Índice de Anexos

Anexo I – Bovikalc.....	77
Anexo II – Apreciação da CEBEA-ULHT.....	79
Anexo III – Material e métodos.....	81

Índice de Figuras

Figura 2. 1 Concentração total de Ca no plasma antes e após o parto.....	22
Figura 2. 2 Metabolismo do Cálcio numa vaca leiteira de 600kg no início de lactação. O efeito da HPT na homeostasia do Cálcio.	23
Figura 2. 3 Zonas de reabsorção de Ca no nefrónio.	24
Figura 2. 4 Regulação da absorção gastrointestinal de Ca. Representação esquemática do mecanismo de absorção transcelular intestinal.....	28
Figura 2. 5 Ação da HPT na membrana celular.	31
Figura 2. 6 Efeito do tratamento de Cálcio intravenoso com 10,8g de Cálcio elementar na concentração total de Cálcio sérico.	35
Figura 2. 7 Efeito do cloreto de Cálcio oral e carbonato de Cálcio oral no Cálcio plasmático, expresso em percentagem de valor base.....	36
Figura 2. 8 Efeito da administração de dois bolus de Bovikalc no cálcio plasmático.....	37
Figura 2. 9 Efeito de uma administração subcutânea de 500mL a 23% de uma solução boroglucanato de Cálcio (10,5g de Ca) no Ca plasmático	38
Figura 2. 10 Consequências da hipocalcémia clínica e subclínica.	45
Figura 4. 1 Resultados da análise da média das duas amostras de Ca consoante o grupo e respetiva linha de tendência, em mg/dL.....	54
Figura 4. 2 Valores individuais das medições de Ca.	55
Figura 4. 3 Níveis de Ca obtido nos diferentes grupos.....	56
Figura 4. 4 Distribuição da frequência relativa da ocorrência ou não de mastite no grupo de controlo e Bovikalc.....	57
Figura 4. 5 Distribuição da frequência relativa da ocorrência ou não de metrite no grupo de controlo e Bovikalc.....	58

Figura 4. 6 Distribuição da frequência relativa da ocorrência ou não de cetose no grupo de controlo e Bovikalc.....	59
---	----

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 Número de intervenções observadas e realizadas.....	18
Tabela 3. 1 Número de lactações das vacas presentes no estudo.	49
Tabela 4. 1 Medições dos níveis de Ca do grupo de Bovikalc.....	53
Tabela 4. 2 Medições dos níveis de Ca do grupo de controlo.	53
Tabela 4.3 Resultados da análise descritiva das medições dos níveis de Ca, da 1 ^a e 2 ^a medições do grupo Bovikalc e de controlo.	54
Tabela 4. 4 Resultados da análise da diferença entre medições.	54
Tabela 4. 5 Resultados da análise da produção de leite aos 100 dias.....	57
Tabela 4. 6 Resultados da análise das medições de β -hidroxibutirato.	59

Introdução

Este estudo desenvolveu-se numa exploração de leite situada no Ribatejo, no ano letivo 2015/2016, com o título «Efeito da suplementação de Cálcio oral no pós-parto como método de prevenção de hipocalcémia».

A necessidade de cálcio (Ca) pela vaca é maior logo após o parto em que para a produção de colostro e posteriormente de leite, são necessárias grandes quantidades. Caso os mecanismos de homeostasia do cálcio não consigam manter os níveis de Ca deparamo-nos com hipocalcémia, que poderá ser clínica, e conduzir à síndrome da vaca caída (Goff, 2014).

A opção do tema surgiu pela existência de um número elevado de vacas caídas na exploração, indicativo de que o protocolo aplicado, que consistia na administração de 500 mL de Ca endovenoso logo após o parto, não estava a resultar. Seguiu-se alguma pesquisa bibliográfica e encontramos uma das formas mais apoiadas de suportar os níveis de cálcio da vaca após o parto, nomeadamente a administração de cálcio oral, chegando desta forma à questão de investigação deste estudo: Qual o efeito da administração oral de cálcio, logo após o parto, nos níveis séricos de cálcio?

Para responder à nossa questão de investigação decidimos desenvolver um estudo, que incluiu 41 vacas divididas em dois grupos: um de controlo (n=21) e o grupo de tratamento (n=20).

Deste modo decidimos avaliar primeiro o efeito da administração oral de Ca, logo após o parto, nos níveis séricos de Ca e em seguida avaliar a relação dos níveis de Ca com a ocorrência de hipocalcémia clínica, assim como de afeções no pós-parto dependentes desses mesmos níveis.

Estas alterações nos níveis de Ca têm consequências fisiológicas, como imunossupressão exacerbada e redução da contração do músculo-esquelético e liso, afetam a função gastrointestinal e a fertilidade, tendo também consequências clínicas, incluindo a distocia, prolapso uterino, retenção de placenta, endometrite e mastite sendo difícil encontrar outro fator que esteja associado a tantas complicações veterinárias como a hipocalcémia (Mulligan, Rice, & Doherty, 2006).

Caso não sejam tomadas medidas preventivas, o risco do animal ser removido da exploração, assim como o risco de ocorrência de complicações derivadas da hipocalcémia são altos, razões que tornam importantíssima a aplicação de um protocolo preventivo.

A pertinência deste estudo reside no facto da incidência entre explorações variar muito, o que é indicativo do potencial de ser manipulada (DeGaris & Lean, 2008), nomeadamente pela aplicação de um programa preventivo que consista na administração de cálcio oral (Thilsing-Hansen, Jørgensen, & Østergaard, 2002). Este trabalho é um passo no sentido de encontrar protocolos alternativos, especificamente ao avaliar o efeito da administração de cálcio oral após o parto.

Capítulo I – Relatório do Estágio

O estágio curricular foi realizado na Agropecuária Afonso Paisana Lda., que se trata de uma exploração leiteira com cerca de 220 vacas à ordenha, localizada na Herdade dos Coelho nos Foros de Salvaterra. Este decorreu de 1 de setembro de 2015 a 1 de março de 2016 e contou com a orientação do Dr. João Paisana. O horário realizado foi, normalmente, das 8h30m às 18h30m, com intervalo para almoço, visto só terminar quando todas as tarefas eram finalizadas, de forma a estar presente e participar em todas as tarefas e funções de um médico veterinário numa vacaria de leite.

O principal objetivo do estágio era ganhar competências de forma a conseguir realizar uma gestão autónoma da exploração, com a ajuda do programa de gestão da vacaria “DairyPlan”, tendo desta forma acesso a toda a informação necessária, incluindo os índices reprodutivos e produtivos, planos sanitários e gestão do manejo reprodutivo, o que implicou uma aprendizagem do funcionamento do programa, nomeadamente interpretação e criação de listas, competências estas também adquiridas. Para além de uma gestão autónoma da exploração todas as atividades que competem ao médico veterinário foram realizadas e treinadas, nomeadamente:

O controlo reprodutivo - Este inclui a deteção deaios, através da atividade medida pelo podómetro e marcação da base da cauda com tinta, técnica de inseminação e diagnóstico de gestação em diferentes fases: aos 30 dias após a inseminação com recurso a ultrassonografia, aos 55 dias a confirmação da gestação e sexagem com recurso também à ultrassonografia, aos 110 dias e finalmente na secagem e na passagem para o pré-parto, a confirmação da manutenção da gestação através da palpação transrectal. Na secagem é também aplicado o Kexxtone® (Kexxtone®, Elanco Animal Health, Hampshire, United Kingdom).

Resolução de partos distócicos - Com utilização, em alguns casos, de fórceps.

Controlo pós-parto - No qual era avaliada a condição corporal, assim como medida a temperatura. Mais tarde eram novamente avaliadas, procurando sinais de metrite e medido o valor de β -hidroxibutirato sérico, de forma a avaliar o balanço energético negativo e consequente probabilidade de deslocamento de abomaso. Em caso de positividade, era instituída terapêutica individual. Os resultados de todas as medições são analisados mensalmente, para avaliar o BEN no grupo. É também administrado a

todas as vacas com mais de uma gestação 500 mL de cálcio endovenoso, logo após o parto.

Plano vacinal aplicado – Na passagem para o pré-parto vindo do grupo das secas, as vacas eram vacinadas com Rotavec Corona (Rotavec® Corona, MSD Animal Health, Porto Salvo, Paço de Arcos), de forma a prevenir diarreias nos vitelos, enquanto secas eram também vacinadas com Clostrivax (Clostrivax®, UNIVETE, S.A, Lisboa) e os vitelos nos primeiros dias de vida eram vacinados com Rispoval intranasal (Rispoval Rs+PI3 IntraNasal®, Zoetis, Porto Salvo, Lagoas Park) para prevenir pneumonias. Ao longo do estágio, as duas primeiras vacinações foram descontinuadas.

Descorna – Realizada com a administração de anestesia local para a correta insensibilização da zona, corte com fio serra e hemóstase;

Diagnóstico e tratamento - Casos clínicos que surgiram como vacas caídas, através da administração de cálcio intravenoso e oral, de vacas com níveis de cetose altos através da administração de propilenoglicol e glucose endovenosa, de vacas com mastites nas quais eram administrados antibióticos intramamários e metrites nas quais eram administrados antibióticos sistémicos;

Saneamento - Corte do pelo nas zonas de aplicação das tuberculinas, medição da espessura da pele, aplicação das tuberculinas e medição passados 3 dias das mesmas zonas de forma a avaliar a reação.

Relativamente aos vitelos, existia em prática um protocolo de administração de colostro no qual a sua densidade era avaliada usando a escala Brix e no caso de ser superior a 22, eram administrados, o mais rapidamente possível, no mínimo 4 litros, tornando isso uma prioridade na vacaria. Posteriormente (passadas 24 horas) era feita a medição de sólidos séricos totais no sangue dos vitelos para aferir a transferência de imunidade. Realização de uma correta desinfeção do umbigo de modo a prevenir onfaloflebites e infeções ascendentes, gestão dos grupos de vitelos, desmame e tratamento de diarreias e pneumonias.

Segue abaixo a tabela 1.1 com a quantidade de intervenções acima referidas realizadas:

Tema	Ações	Número
Nascimentos	Nº Partos	144
	Controlo pós-parto	144
Controlo Reprodutivo	Ecografia 30 Dias	185
	Ecografia 50 a 75 Dias	98
	Sexagem	56
	Secagem	118
	Kexxtone®	122
	Pré-parto	143
	Cálcio	87
Tratamentos	Glucose	74
	Pneumonia	3
	Metrite	8
	Mastite	17
Plano de Vacinação	Clostrivax®	158
	Rispoval®	91
	Rotavec Corona®	89
Saneamento		351
Vitelos	Colostro	148
	Pneumonia	17
	Diarreia	10

Tabela 1.1 Número de intervenções observadas e realizadas no âmbito do estágio.

Capítulo II – Enquadramento Teórico-Conceptual

2.1 Contextualização

“The transition from pregnant, nonlactating state to the nonpregnant, lactating state is too often a disastrous experience for the cow.” (Goff & Horst, 1997, p.1260)

Os programas de melhoramento genético da vaca leiteira têm na sua maioria das vezes o objetivo de melhorar a produção leiteira, mas essa seleção acarreta também consequências a níveis fisiológicos, quer na fertilidade, controlo metabólico assim como na imunidade (Butler, 2000).

A gravidez, a redução do consumo de alimento na fase final da gestação, o parto e a lactogênese, têm efeitos dramáticos no metabolismo das vacas de leite no período de transição ou peri-parto, sendo este definido pelas três semanas antes do parto até três semanas após o parto (Grummer, 1995). A diminuição da ingestão de matéria seca, agravada pela necessidade crescente de nutrientes para a produção de leite, juntando outras causas de ‘stress’ associadas ao parto, levam a que a maior parte das doenças infecciosas e desordens metabólicas ocorram durante este período. É também nesta fase em que a febre do leite, cetose, retenção das membranas fetais, metrites e deslocamento do abomaso ocorrem com mais frequência, tornando este período crítico para a saúde, produção e rentabilidade da vaca (Drackley, 1999).

Três funções básicas devem ser mantidas neste período de forma que a vaca se mantenha saudável: adaptação do rúmen a dietas de lactação com alta densidade energética, manutenção da normocalcémia e manutenção de um forte sistema imunitário (Goff & Horst, 1997).

2.2 Fisiologia do Cálcio

“O Cálcio é um mineral que desempenha um papel central na homeostasia dos animais vertebrados, incluindo contração muscular, coagulação do sangue, atividade enzimática, excitabilidade neuronal, secreção hormonal e adesão celular, para além de ser um componente estrutural essencial do esqueleto.” (Rosol & Capen, 1997, p.619)

O Ca é também um importante catião fisiológico (El-Samad, Goff, & Khammash, 2002), com duas principais funções: manter a integridade estrutural dos ossos e dos dentes e como ião mensageiro ou ião regulador (Ebashi, 1985), utilizando o gradiente de concentração entre o fluído extracelular e o citoplasma, permitindo que o Ca funcione como um ião

sinalizador para ativar processos intracelulares (Rosol & Capen, 1997) como a liberação do neurotransmissor acetilcolina na junção neuromuscular (Oetzel, 2011).

O início de cada lactação desafia a capacidade da vaca de manter a concentração normal de Ca no sangue (Oetzel, 2012). Devendo essa concentração na vaca adulta ser mantida entre 8,5 e 10,0 mg/dL (2,1 e 2,5 mmol/L) (Goff, 2014). O nadir na concentração de Ca no sangue ocorre passadas doze a vinte e quatro horas após o parto (Goff, 2014).

2.2.1 Formas de Cálcio

O Ca no sangue encontra-se distribuído da seguinte forma: 50% ligado a proteínas como a albumina, 42% a 48% do Ca existe sobre a forma ionizada, sendo que em condições acídicas se encontra mais perto dos 48% e em alcalinas dos 42% e finalmente os 3% a 7% do Ca do sangue encontram-se ligados a aniões solúveis como o citrato, fosfato, bicarbonato e sulfato. O Ca ionizado (Cai) é a porção biologicamente ativa de Ca no sangue (Goff, 2014).

Numa vaca de 600 kg existem 3,0 a 3,5 g de Ca no plasma, 8 a 9 g em todos os fluídos extracelulares (fora do osso), no esqueleto encontram-se cerca de 7,8 a 8,5 kg de Ca, já no interior de todas as células do corpo se encontra apenas 1 g (Goff, 2014).

2.2.2 Hipocalcemia

“Quase todas as vacas experienciam algum grau de hipocalcemia, sendo que a sua severidade e duração dependem da integridade dos seus mecanismos de homeostasia do cálcio.” (Goff, 2014, p.359)

Caso a concentração normal de Ca no sangue não consiga ser mantida deparamo-nos com hipocalcemia, podendo esta ser subclínica, quando não apresentam sinais clínicos e a concentração de Ca no sangue se mantém entre 5,5 e 8,0 mg/dL (1,38 e 2,0 mmol/L) (Goff, 2014), afetando aproximadamente 50% das vacas com mais do que uma lactação (Reinhardt, Lippolis, McCluskey, Goff & Horst, 2011) ou clínica (*paresia puerperalis* ou febre do leite) tratando-se neste caso de uma afeção não febril que ocorre quando existe uma deficiência aguda de Ca, normalmente abaixo dos 5,5 mg/dL, causando uma disfunção neuromuscular com paralisia flácida, colapso circulatório e depressão da consciência (Oetzel & Goff, citado por Mendelez, 2008) (Figura 2.1).

A homeostasia do Ca é regulada pela calcitonina, que diminui a concentração de Ca no sangue, ao contrário da hormona paratiroide (HPT) e 1,25-dihidroxyvitamina D3 (1,25-D3) que por sua vez aumentam a concentração de Ca no sangue (DeGaris & Lean, 2008).

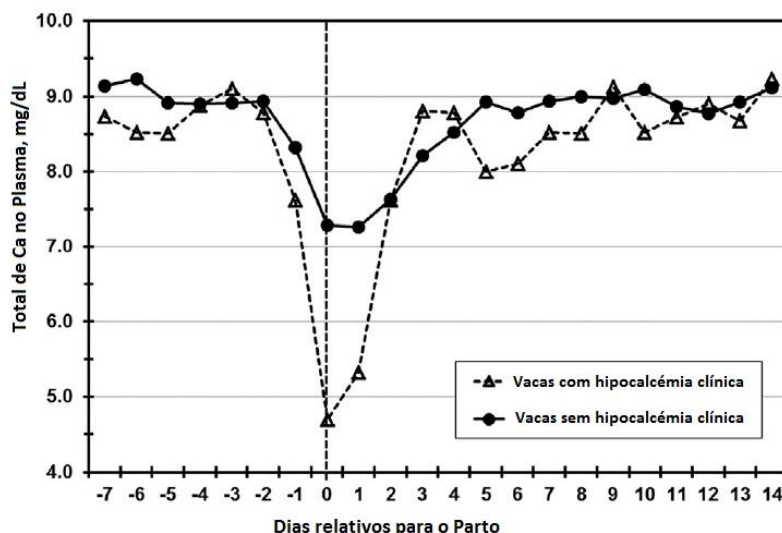


Figura 2. 1 Figura adaptada de Oetzel, 2013. Concentração total de Ca no plasma antes e após o parto.

2.2.3 Mecanismos de controlo dos níveis de cálcio em Hipocalcemia

2.2.3.1 Papel da Hormona da Paratiroide (HPT)

As glândulas Paratiroides controlam primariamente a homeostasia do Ca, sempre que concentrações de Ca_i no fluído extracelular descem abaixo da concentração necessária para manter ocupados todos os recetores sensitivos de Ca presentes na superfície das células da paratiroide e nos túbulos renais (Hendy & Canaff, 2015), é secretada HPT em grandes quantidades (Brown, 2007). Os recetores sensitivos de Ca estão também envolvidos na resposta a citocinas pró-inflamatórias libertadas, como parte da resposta imune inata a lesão de tecido e inflamação (Hendy & Canaff, 2015).

A HPT é um 84 Aminoácido Péptido que se liga a recetores na superfície dos seus tecidos-alvo. As primeiras células alvo são os osteoblastos, os osteócitos do osso e as células epiteliais tubulares renais (Goff, 2014).

O recetor da HPT é uma proteína transmembranar com uma porção que se estende para o exterior da célula mais concretamente para o meio extracelular onde a HPT se vai ligar especificamente, existindo também uma porção interior que por sua vez se estende para o interior da célula, esta encontra-se por sua vez ligada a Proteínas G com as unidades α , β e γ .

A proteína G- α tem uma molécula de Guanosina Difosfato (GDP) ligada. Quando a HPT se liga ao recetor, este altera a sua estrutura terciária, levando também a uma alteração da forma de G- α assim como à troca da GDP por Mg⁺⁺Guanosina Trifosfato (GTP). Ao ligar-se Mg⁺⁺Adenosina Trifosfato (ATP) altera novamente a conformação de G- α provocando a sua dissociação do recetor da HPT. Em seguida forma um complexo com Adenilil ciclase que se localiza na membrana celular adjacente, este complexo consegue por fim converter MG⁺⁺ATP em Adenosina Monofosfato (AMP) cíclico. O AMP cíclico serve como mensageiro secundário para estimular a proteína kinase e outras vias de forma a retomar os níveis normais de Ca extracelular (Goff, 2014).

A libertação de HPT irá aumentar diretamente os níveis de Ca por três vias, pelo aumento da reabsorção renal de Ca, através da reabsorção do Ca dos ossos por parte dos osteoclastos e finalmente pela ação dos osteócitos que realizam a osteólise dos ossos (Figura 2.2).

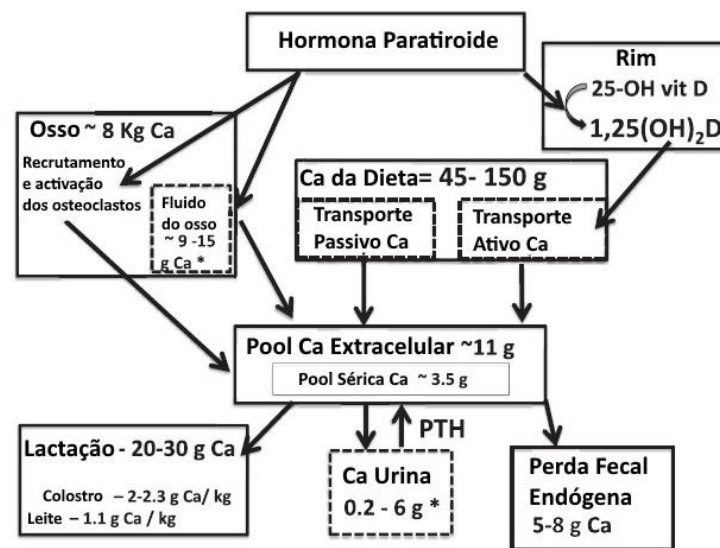


Figura 2. 2 Esquema adaptado de Goff, 2014. Metabolismo do Cálcio numa vaca leiteira de 600kg no início de lactação. O efeito da HPT na homeostasia do Cálcio.

2.2.3.1.1 Reabsorção Renal de cálcio

“Os rins absorvem aproximadamente quarenta vezes mais cálcio do que o absorvido pelo trato intestinal, devido ao alto fluxo de sangue e ultrafiltração no glomérulo.”

(Rosol, Chew, Nagode, & Capen, 1995, p.53)

Os rins reabsorvem normalmente 98% ou mais do Ca filtrado. Este alto grau de reabsorção é importante para a manutenção do balanço de Ca no corpo, mas permite também, se necessário, a excreção de grandes quantidades de Ca na urina (Rouse & Suki, 1990).

A maior parte do Ca que pode ser filtrado (ionizado e em complexo) entra no filtrado glomerular por convecção sendo depois reabsorvido nos túbulos renais. Desse Ca filtrado 70% é absorvido de forma não regulada nos túbulos contornados proximais por difusão e convecção, já na porção ascendente da ansa de Henle são absorvidos 20%. Grande parte da reabsorção do Ca filtrado dá-se de forma passiva, ocorrendo também de forma ativa através da estimulação do local da ativação da regulação da reabsorção do Ca, nos túbulos contornados distais que reabsorvem 10% do Ca filtrado, sendo este mecanismo estimulado pela HPT (Rouse & Suki, 1990) (Figura 2.3).

Em vacas alimentadas com dietas com alta diferença catião-anião na dieta (DCAD), a excreção de Ca pela urina é menos de 0,5 g de Ca por dia. Numa perturbação leve no Ca sérico, a redução da perda de Ca pela urina é suficiente para trazer o Ca para valores normais. Já na lactação a vaca perde 20 a 30 g de Ca no colostro por dia, não sendo suficiente essa redução, vendo-se assim obrigada, com o objetivo de prevenir a hipocalcemia, a retirar Ca do osso e aumentar a absorção de Ca intestinal (Goff, 2014).

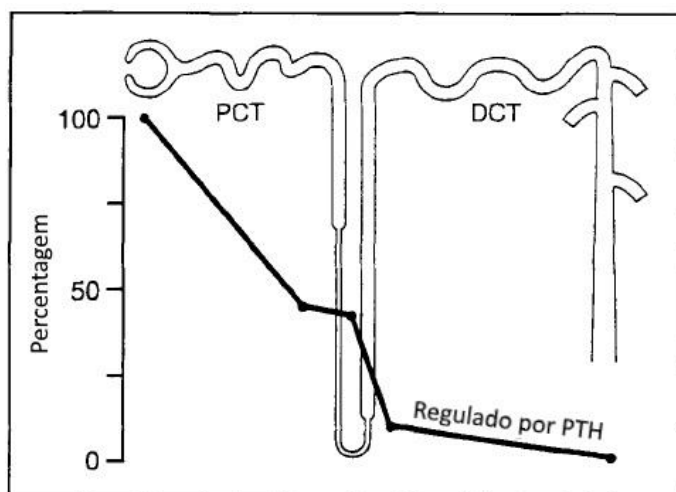


Figura 2. 3 Figura adaptada de Rosol, 1995. Zonas de reabsorção de Ca no nefrônio.

2.2.3.1.2 Reabsorção óssea de cálcio pelos osteoclastos

Leva normalmente vários dias até que a reabsorção óssea dos osteoclastos se torne totalmente ativa (Goff, Littledike, & Horst, 1986).

A maioria do Ca encontrado no esqueleto (> 99%) encontra-se sobre a forma de cristais de hidroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ligados à matriz de colagénio. O Ca presente nos cristais só consegue ser mobilizado pelos osteoclastos através da secreção de enzimas e ácido para digerir a matriz de colagénio que os envolve, libertando assim o Ca e o PO_4^{2-} , que voltam para o sangue (Goff, 2014).

Os Osteoclastos, que estão relacionados com os macrófagos e monócitos, não têm recetores para a HPT, estes encontram-se nos osteoblastos que secretam por sua vez fatores como o ativador do recetor do fator nuclear $\kappa\beta$ ligante e o fator estimulante da colônia de macrófagos (M-CSF) (Hoorn & Zietse, 2013). Estes fatores fazem com que os osteoclastos existentes comecem a reabsorver colagénio e levam também à diferenciação das células progenitoras de osteoclastos tornando-os em novos osteoclastos (Goff et al., 1986).

2.2.3.1.3 Osteólise osteocítica do cálcio dos ossos

“Em muito menos quantidade, mas crítica, é a quantidade de cálcio que se encontra em solução presente nas lacunas em torno dos osteócitos e do sistema de canalículos no osso.”
(Goff, 2014, p.363)

Os osteócitos são células em forma de aranha presentes no interior da matriz mineralizada do osso. Estes providenciam uma rede celular no osso estando ligadas por extensões protoplasmáticas, que com ‘*gap junctions*’ presentes no topo destas extensões possibilitam a sua comunicação. Estas células são consideradas arquitetas na remodelação do osso, regulando a atividade dos osteoblastos e osteoclastos, para além da sua relação com a regulação da reabsorção de fosfato renal (Teti & Zallone, 2009).

Todos juntos, os osteócitos formam uma superfície celular estimada cem vezes maior que a superfície trabecular do osso, o espaço detetável presente entre a superfície de osso mineralizado e a superfície de osteócitos contém matriz extracelular não mineralizada, proteínas não colagénias presentes nas zonas de contacto do osso e fluído do osso e proteoglicanos. Esta matriz facilita a formação de fluídos do osso e a regulação da atividade dos osteócitos. O fosfato de Ca é dos sais de Ca mais abundante no osso, sendo pouco solúvel, para isso as proteínas não colagénias, têm a capacidade de se ligar a iões de Ca, aumentando assim a sua solubilidade, este processo pode ser revertido (Teti & Zallone, 2009).

Este compartimento de fluído de osso está separado, mas em equilíbrio com os fluídos extracelulares, tendo 9g de Ca em estado de alcalose metabólica e 15g em acidose

metabólica. A resposta dos osteócitos à HPT é feita em minutos, enviando Ca do fluído do osso para o fluído extracelular (Goff, 2014).

2.2.3.1.4 Absorção de cálcio na dieta

Em último lugar, para evitar a hipocalcémia a vaca pode usar o Ca da dieta, para isso o Ca, como todos os minerais, tem de estar em solução para atravessar o trato intestinal e entrar no sangue (Goff, 2014).

Os ácidos do abomaso solubilizam grande parte do Ca inorgânico, apesar de grande parte do Ca das forragens estar ligado a materiais orgânicos, não estando desta forma disponíveis para a vaca (Goff, 2014).

Cerca de 90% do Ca é absorvido no intestino delgado, este Ca solúvel pode atravessar o epitélio gastrointestinal por dois mecanismos: absorção transcelular intestinal dependente de vitamina D, ocorrendo maioritariamente no duodeno e absorção paracelular intestinal de Ca, que por sua vez ocorre por todo o intestino delgado. A quantidade de Ca absorvido no intestino grosso e cólon é muito pequena não ultrapassando os 10% do total absorvido (Bronner, 2009).

É a quantidade de tempo que o quimo está nos diferentes segmentos de intestino delgado que determina a quantidade de Ca que vai ser absorvido em cada segmento, encontrando-se apenas alguns minutos no duodeno e na segunda metade do intestino delgado mais de duas horas (Bronner, 2009).

A percentagem da absorção intestinal é indiretamente proporcional à quantidade presente na dieta. Em dietas pobres em Ca a absorção vai até aos 95%, já em dietas ricas em Ca a absorção fica pelos 40%. Contudo as dietas ricas em Ca aumentam a sua concentração sérica devido à absorção paracelular, já nas dietas pobres essa concentração mantém-se normal devido à compensação da HPT (Rosol et al., 1995).

2.2.3.1.5 Vitamina D

Para a correta compreensão de que forma se dá a absorção transcelular intestinal temos primeiro de falar da vitamina D, mais concretamente a sua forma hormonal 1,25-dihidroxitamina D (1,25[OH]₂D) indispensável para o processo.

A vitamina D é sintetizada na pele da vaca através da irradiação de raios B ultravioleta do sol ou administrada na dieta, sendo apenas um precursor da hormona 1,25(OH)₂D. Ao entrar na corrente sanguínea a vitamina D é extraída do sangue pelo fígado, onde é hidroxilada no carbono 25 formando 25-OH vitamina D, sendo sob esta forma novamente libertada para a corrente sanguínea. Esta é a forma mais comum de vitamina D no sangue e é esta a forma pela qual se avalia os níveis de vitamina D. Por sua vez a 25-OH vitamina D vai para os rins, nos quais se ocorrer a estimulação com HPT esta é convertida na hormona 1,25(OH)₂D pela enzima 1 α -hidrolase. Em seguida o rim secreta a hormona para a corrente sanguínea com destino ao intestino (Goff, 2014).

A 1,25(OH)₂D é uma hormona esteroide que se difunde nas células-alvo e interage com o seu recetor, recetor de vitamina D (RVD), localizado no núcleo da célula. Este recetor encontra-se em todas as células epiteliais do trato gastrointestinal, onde começa a transcrição e translação dos genes necessários para ativar o transporte ativo do Ca da dieta pelas células epiteliais (Goff, 2014).

A hormona 1,25(OH)₂D está também relacionada com a proteção da mucosa intestinal, assim como com a absorção intestinal de fosfato (Christakos, 2012).

2.2.3.1.6 Absorção transcelular intestinal dependente de vitamina D

Visto que as concentrações de Cai intracelular são muito baixas, todas as dietas contêm Ca suficiente para garantir que a concentração de Ca no lúmen do intestino excede a do interior das células intestinais. Esta diferença na concentração cria um gradiente eletromagnético que levaria o Ca entrar pela membrana apical, mas para isso esta teria de ser permeável (Goff, 2014).

O movimento do Ca através do enterócito envolve três passos: 1) inicia-se com a entrada via dois canais de Ca, um dos quais é o ‘*transiente receptor potential cation channel subfamily V*’ (TRPV6) sendo a produção desta proteína estimulada pela 1,25(OH)₂D; 2) a isto segue-se a difusão intracelular, com a ajuda da molécula de transporte calbindina D_{9k}, também dependente da vitamina D à qual o Ca se liga, levando-a para a membrana basolateral; 3) finalmente dá-se a extrusão, mediada maioritariamente pela Ca-ATPase, a terceira proteína mediada pela vitamina D, que bombeia o Ca para a corrente sanguínea (Bronner, 2009; Goff, 2014) (Figura 2.4).

São necessárias estas três proteínas para o transporte ativo de Ca, dependendo da estimulação pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, este processo requer tempo, demorando 48 horas após o aumento da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ à total implementação do transporte ativo de Ca (Goff, 2014).

Outras hormonas como o estrogénio e prolactina aumentam o transporte intestinal ativo de Ca, independentemente da vitamina D, estimulando o TRPV6. Já com a administração de glucocorticoides assim como com o envelhecimento ocorre uma diminuição da absorção de Ca intestinal, devido à diminuição da expressão do TRPV6 e da calbindina D_{9k} (Christakos, 2012).

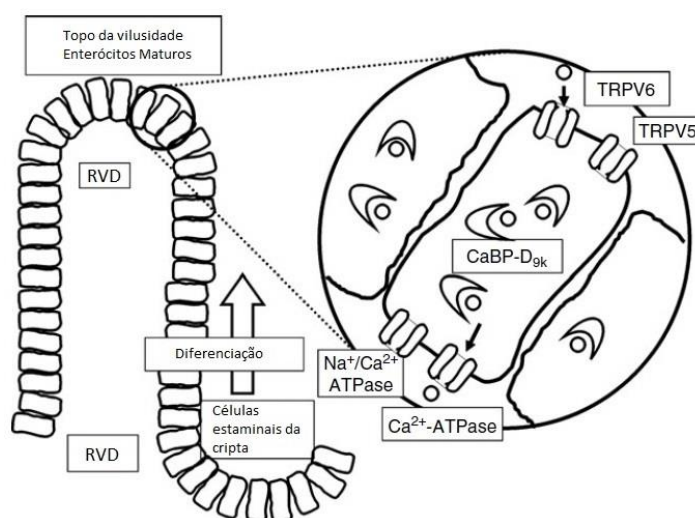


Figura 2. 4 Esquema adaptado de Martín-Tereso & Verstegen, 2011. Regulação da absorção gastrointestinal de Ca. Representação esquemática do mecanismo de absorção transcelular intestinal. RVD recetor de vitamina D; TRPV5/6, canais de entrada de Ca; CaBP-D_{9k}, calbindina intestinal.

2.2.3.1.7 Absorção paracelular intestinal de cálcio

Este é um segundo mecanismo de absorção de Ca mas independente da vitamina D. Envolve o movimento do Ca do lúmen do intestino para os fluídos extracelulares entre as células epiteliais, ocorrendo simplesmente devido ao gradiente de concentração, ou seja, quando a concentração de Ca_i na proximidade das ‘tight junctions’ entre as células epiteliais excede significativamente a concentração do fluído extracelular ($\sim 1.25\text{mM}$), o Ca atravessa as ‘tight junctions’ diretamente para o fluído extracelular e para o sangue. Esta via funciona por todo o intestino, mais na porção distal, quando o Ca presente na dieta é alto ou adequado (Christakos, 2012).

2.3 Etiologia da Hipocalcemia

Conforme visto anteriormente o período de transição é um período crítico para a vaca e uma das razões é o teste aos mecanismos de homeostasia da vaca, que têm de competir com a necessidade de Ca para a lactação, nomeadamente o colostro, que são ricos em Ca.

O colostro ou o leite produzido nos primeiros dias de lactação têm 1,7-2,3g e 1,1g de Ca por kg respetivamente, retirando 20 a 30g de Ca do plasma e fluído extracelular por dia (Goff, 2014), obrigando a vaca a ativar os seus mecanismos de homeostasia para repor o Ca utilizado.

A homeostasia do Ca falha em algumas vacas não pela falta de produção de HPT (Mayer et al., 1969 citado por J. P. Goff, 2014), mas sim pela refração temporária dos tecidos-alvo à estimulação com HPT (Goff, Reinhardt, & Horst, 1989).

Os níveis de Ca pós-parto tem uma heritabilidade de 0,11 (Tveit, Svendsen, & Hove, 1991).

Foram identificados em diferentes estudos os fatores que interferem na homeostasia do Ca, essas causas serão descritas em seguida.

2.3.1 Fatores Metabólicos

2.3.1.1 Alcalose metabólica

A alcalose metabólica predispõe à hipocalcemia clínica e subclínica, ao mitigar a resposta da vaca à HPT (Goff et al., 1991), acredita-se agora que se deve à alteração da conformação (estrutura terciária) do recetor da HPT, diminuindo desta forma a sensibilidade dos tecidos (Goff, 2008)(Figura 1.5).

Ao falhar a resposta à HPT todos os mecanismos dela dependentes vão estar comprometidos. Nomeadamente a osteólise osteocítica, a reabsorção óssea pelos osteoclastos, ao nível dos rins ocorre uma diminuição da reabsorção renal de Ca e uma falha na conversão da 25-OH vitamina D em 1,25(OH)₂D impedindo o aumento da absorção intestinal de Ca (Goff, 2008).

2.3.1.2 Hipomagnesiemia

“A hipomagnesiemia é um dos principais fatores de risco para a febre do leite.”

(Goff, 2008, p.50)

A manutenção de uma concentração normal de magnésio (Mg) no plasma é quase totalmente dependente de um fluxo constante de Mg da dieta, é absorvido no intestino delgado em vitelos e com o crescimento a sua absorção passa a ocorrer no rúmen e retículo, os fatores importantes para a sua absorção são a sua concentração na dieta e a integridade dos seus mecanismos de transporte (Martens & Rayssiguier, 1980).

A hipomagnesiemia é a diminuição da concentração de Mg no sangue e ocorre quando os valores se encontram abaixo dos 1,8 mg/dL (Goff, 2008).

Em humanos reconhece-se que a hipomagnesiemia pode causar hipocalcemia e que só a terapia com Mg recupera a concentração de Ca no sangue, não respondendo a terapia de Ca e/ou vitamina D (Rude, 1998).

A hipomagnesiemia, afeta o metabolismo do Ca por duas vias principais:

Reduzindo a sensibilidade dos tecidos à HPT (Rude, 1998), a integridade da interação entre a HPT e o seu recetor é fundamental para a homeostasia do Ca e a hipomagnesiemia, independentemente da alcalose metabólica, pode interferir com a ação da HPT nos tecidos-alvo (Goff, 2008). A enzima adenilil ciclase tem um local de ligação para o Mg e a ausência de um ião de Mg não permitirá que a adenilil ciclase converta Mg ATP em AMP cíclico, nem que a fosfolipase C seja ativada, não sendo produzidos os mensageiros secundários diaciglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato (Goff, 2008). É evidente que o ATP e GTP têm de se encontrar em complexo com um ião de Mg com o objetivo de estabilizar a sua forma e permitir que encaixe nos locais catalíticos da maioria das enzimas (Goff, 2014). Não é claro se os níveis de Mg intracelular podem descer para valores que limitem todo o processo (Goff, 2014).

Reduzindo a secreção de HPT, os recetores sensíveis a Ca nas células da glândula paratiroide são proteínas-G, a depleção de Mg intracelular interfere com a habilidade da proteína G- α interagir com a adenilil ciclase, impossibilitando assim a conversão da Mg-ATP em AMP cíclico, não sendo desta forma secretada HPT (Goff, 2014) (Figura 2.5). A concentração de Mg no plasma tem de ser inferior a 1,4 mg/dL durante um certo período de tempo para este bloqueio na secreção ocorrer (Goff, 2014). Quando demonstram sinais clínicos (tetania) indica que para além de existir uma concentração sanguínea de Mg entre 0,8 e 1,4 mg/dL, existe também um decréscimo na concentração de Ca no sangue abaixo dos 5mg/dL (Goff, 2014).

A redução na produção de HPT e a redução da sensibilidade à HPT vão mais uma vez levar à falha dos mecanismos HPT dependentes, anteriormente mencionados na alcalose metabólica, diminuindo a mobilização do osso, absorção intestinal e reabsorção renal do Ca.

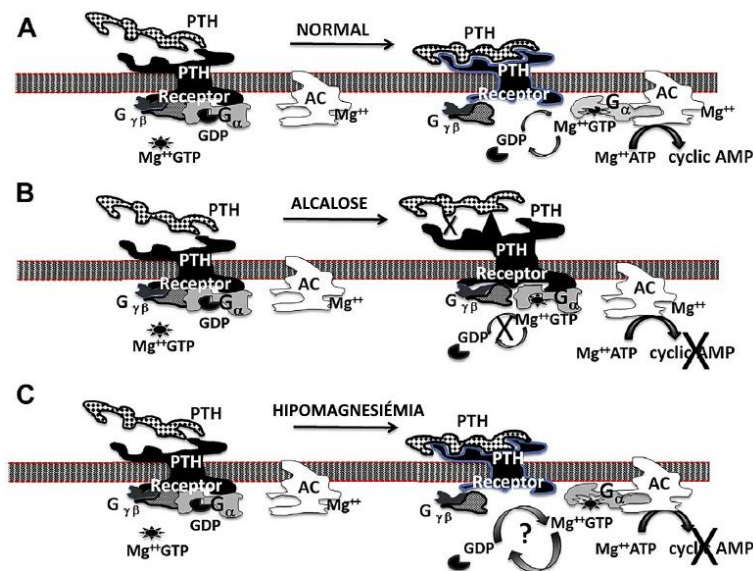


Figura 2. 5 Esquema de Goff, 2014. Ação da HPT na membrana celular. (A) Resposta normal. (B) Alteração da estrutura terciária do recetor, perdendo a afinidade à HPT (devido à alcalose). (C) A enzima adenilil ciclase necessita de Mg como co-fator, em hipomagnesiemia não é completamente ativado.

2.3.2 Outros Fatores

“A raça, idade e produção de leite são importantes fatores de risco para a hipocalcemia clínica nas vacas de leite.” (Oetzel, 2011, p.239)

2.3.2.1 Idade

Existe uma correlação positiva entre a incidência de hipocalcemia e a idade (Sato et al., 2013). As vacas mais velhas, principalmente a partir da terceira lactação, têm grande dificuldade em manter a homeostasia do Ca, aumentando o risco de hipocalcemia clínica 9% por lactação (Lean, DeGaris, McNeil, & Block, 2006) isto deve-se:

Ao atingir a maturidade do crescimento, que ocorre por volta do fim da primeira lactação, o número de locais ativos para remodelação de osso diminuem. Esta redução significa que existem menos osteoblastos e osteoclastos ativos presentes na superfície do osso, assim como um aumento do tempo da resposta à HPT, visto terem de ser recrutados novos osteoclastos e ser ativada a reabsorção, tudo de forma mais lenta (Goff, 2014).

Com o avançar da idade, existe também uma diminuição do número de recetores para $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ no intestino das vacas (Horst, Goff, & Reinhardt, 1990).

Existe também evidência que o número de recetores para a HPT no rim diminui com a idade (Hanai et al., 1990), podendo o mesmo ocorrer com os osteoblastos e osteócitos (Goff, 2014).

2.3.2.2 Raça

Sabe-se que as raças Jersey e com menor evidência as Vermelhas Suecas e brancas/vermelhas Norueguesas têm uma incidência mais alta de hipocalcémia clínica quando comparadas com as Holstein Frísia (Goff, 2014). O colostro e leite das vacas Jersey têm concentrações de Ca mais altas quando comparadas com as Holstein, mas ao comparar o Ca absorvido durante toda a lactação das Holstein por Kg de peso, essa diferença é esbatida (Goff, 2014).

A razão desta diferença foi documentada por Goff, Reinhardt e Horst (1995) e deve-se a uma redução em 15% no número de recetores para a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ no tecido intestinal das Jersey quando comparadas com as Holstein Frísia. Já as Castanhas Suíças têm um número semelhantes de recetores intestinais para a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ao comparar com as Holstein Frísia (Liesegang, Singer, & Boos, 2008).

2.3.2.3 Condição Corporal

Vacas com alta condição corporal têm maior tendência para desenvolver hipocalcémia clínica (Heuer, Schukken, & Dobbelaar, 1999), devendo-se provavelmente à diminuição da ingestão de matéria seca.

2.4 Incidência

2.4.1 No Mundo

A incidência de hipocalcémia subclínica foi determinada em várias explorações nos Estados Unidos num estudo realizado por Reinhardt et al., (2011), e concluíram que esta aumenta com o número de lactações ou seja com a idade, sendo que estava presente em 25%, 41%, 49%, 51%, 54% e 42% das vacas da 1ª à 6ª lactação, respetivamente.

Para determinar a incidência de hipocalcemia clínica DeGaris e Lean (2008) analisaram estudos realizados desde 1977 até 2008 nos vários continentes. Dos 10 estudos Norte Americanos analisados a incidência era de 3,45% com intervalo de 0 a 7%, nos 10 estudos Europeus analisados era 6,17% com intervalo de 0 a 10%, já nos 10 estudos Australianos analisados era 3,5% com intervalo de 0 a 7%.

2.4.2 Em Portugal

Já em Portugal a situação é ligeiramente diferente, segundo um estudo realizado por Koch (2013) a incidência de hipocalcemia subclínica é de 28,3%, 57,1%, 71,4% e 83,3% em vacas na 2^a, 3^a, 4^a e $\geq 5^a$ lactação, respetivamente.

2.5 Sinais Clínicos

“Nem todas as vacas com hipocalcemia sofrem a síndrome da febre do leite.”

(Goff, 2008, p.55)

Os sinais clínicos foram divididos em três estados segundo Oetzel (2011), em que no estado I são visíveis apenas os primeiros sinais não existindo decúbito, as vacas podem parecer excitadas, nervosas ou fracas, podendo mesmo passar despercebido. No estado II encontram-se em decúbito esternal, exibindo depressão moderada a severa, parálise parcial e normalmente com a cabeça virada para o flanco. Já no estado III estão em decúbito lateral, completamente paralisadas, inchadas e muito deprimidas (coma), ocorrendo a morte ao fim de algumas horas normalmente devido a insuficiência respiratória.

2.6 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico de hipocalcemia subclínica é feito com a medição sérica de Ca²⁺, devendo a amostra ser colhida no nadir, ou seja, 12 a 24 horas pós-parto, fazendo várias recolhas a diferentes vacas com o objetivo de avaliar a situação da exploração (Goff, 2008).

Existem também vários marcadores bioquímicos que ajudam a avaliar o estado de alteração do osso, que se evidencia durante o período de transição com as alterações drásticas do metabolismo do Ca (Sato et al., 2013). Muitos marcadores foram utilizados em gado e humanos entre os quais: Hidroxiprolina que no passado foi muito utilizado (Mosel & Corlett,

1990), enquanto piridinolina (Liesegang et al., 2000), deoxipiridinolina, C-telopeptido cruzado colagénio tipo I (Liesegang et al., 1998), fosfatase ácida resistente a tartrato (Yamagishi et al., 2009), fosfatase alcalina específica do osso e osteocalcina (Sato et al., 2013) utilizados mais recentemente.

2.7 Tratamento

O tratamento da hipocalcémia deve ser realizado o mais cedo possível, especialmente se existe decúbito. A pressão exercida pelo elevado peso da vaca pode causar a síndrome de esmagamento no lado deitado em apenas quatro horas, causando isquemia dos músculos e nervos seguindo-se a necrose dos tecidos, resultando na síndrome de vaca caída (Goff, 2008). Caso não se realize o tratamento cerca de 60% a 70% das vacas morrem (Hibbs, 1950).

2.7.1 Cálcio Intravenoso

O Ca intravenoso não é recomendado para tratar vacas que ainda se encontrem de pé (Oetzel, 2011). Este tratamento aumenta rapidamente a concentração de Ca no sangue para valores muito altos e potencialmente perigosos (Goff, 1999). Uma alta concentração de Ca no sangue pode causar complicações cardíacas fatais e talvez ainda mais importante, incapacitar a habilidade da vaca de mobilizar Ca nesta altura crítica (Oetzel, 2011).

Estados II e III de hipocalcémia devem ser tratados imediatamente com administração intravenosa lenta de 500ml de uma solução com 23% de gluconato de Ca, fornecendo 10,8g de Ca elementar, sendo esta quantidade suficiente para corrigir o ‘deficit’ existente de 4 a 6g (Oetzel, 2012). Administrar doses maiores de Ca no tratamento intravenoso não traz qualquer benefício (Doze, Donders, & Kolk, 2008).

Vacas tratadas com Ca intravenoso sofrem uma recaída nos níveis de Ca passadas 12 a 18 horas (Thilsing-Hansen et al., 2002) (Figura 2.6). De forma a reduzir os riscos de recaída, as vacas que respondem positivamente ao tratamento intravenoso devem tomar uma suplementação adicional de Ca oral, assim que o seu estado passar a alerta e se encontrar apta para engolir, seguindo-se uma segunda toma oral passadas doze horas (Oetzel, 2011; Thilsing-Hansen et al., 2002).

Uma hipocalcémia transitória pode ocorrer em vacas que se deixem de alimentar ou que sofram de períodos de motilidade intestinal reduzida (DeGaris & Lean, 2008).

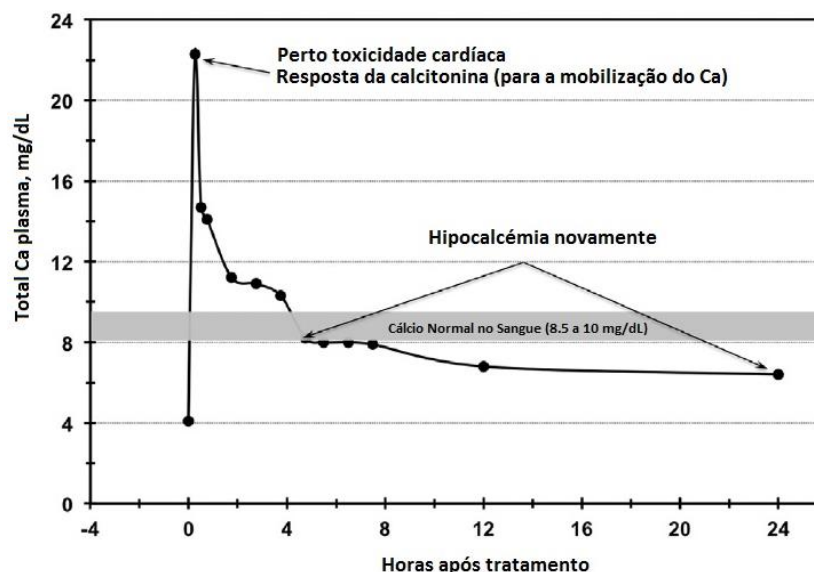


Figura 2. 6 Figura adaptada de Oetzel, 2013. Efeito do tratamento de Cálcio intravenoso com 10,8g de Cálcio elementar na concentração total de Cálcio sérico.

2.7.2 Suplementação oral de cálcio

A suplementação oral de Ca é a melhor abordagem para vacas com hipocalcémia que ainda se encontram de pé, como as vacas no estado I de hipocalcémia ou com hipocalcémia subclínica não detetada (Oetzel, 2011).

A concentração de Ca no sangue é suportada por apenas quatro a seis horas após administração, para a maioria das formas de suplementação oral de Ca (Goff & Horst, 1993, 1994).

2.7.3 Formas de cálcio oral

A fonte do suplemento de Ca oral e a sua forma física influenciam a absorção de Ca e a resposta do Ca no sangue (Oetzel, 2012).

Existem muitas formulações disponíveis no mercado Europeu para administração oral de Ca, a maioria dos estudos que documentam o seu efeito são realizados com preparações contendo sais de Ca facilmente absorvíveis, como o cloreto de Ca que disponibiliza 40 a 50g de Ca por dose como bolus, gel, pasta ou líquido (Thilsing-Hansen et al., 2002).

O cloreto de Ca tem a maior capacidade para suportar a concentração de Ca no sangue (Goff & Horst, 1993, 1994). Isto deve-se à sua alta biodisponibilidade e habilidade

para provocar uma resposta acídica na vaca, o que provoca uma maior mobilização dos seus depósitos de Ca (Garrett R Oetzel, 2012). Administrar uma quantidade normal de cloreto de Ca elementar (50g) numa pequena dose oral resulta na melhor absorção (Oetzel, 2012). Administrar 100g de Ca elementar provoca um pico extremamente alto de Ca no sangue levando à produção por parte da vaca de calcitonina para a proteger da hipercalcémia, impossibilitando os mecanismos da vaca de agir de forma a mobilizar Ca (Oetzel, 2012).

O risco de aspiração é alto quando são administrados líquidos orais, e o cloreto de Ca é muito cáustico para os tecidos respiratórios superiores (Oetzel, 2012).

O propionato de Ca é absorvido de forma mais lenta, provavelmente porque não acidifica e tem de ser dado em doses mais altas, normalmente 75 a 125g (Oetzel, 2012).

O carbonato de Ca na água não aumenta os níveis de Ca de sangue (Goff & Horst, 1993), podendo ser explicado pela baixa biodisponibilidade e a resposta alcalina que provoca (Oetzel, 2012) (Figura 2.7).

Uma combinação entre cloreto de Ca e sulfato de Ca administrado num bolus revestido por gordura (Bovikalc®, Boehringer Ingelheim Vetmedica, St. Joseph, MO), resulta numa melhoria mais sustentada da concentração de Ca no sangue (Figura 2.8), quando comparada com observações de estudos prévios com cloreto de Ca oral ou propionato de Ca em água (Sampson, Spain, Jones, & Carstensen, 2009). Esta melhoria também se deve a uma ligeira acidificação provocada pelo bolus (Blanc et al. 2014), a bula encontra-se no anexo 1.

Em vacas tratadas só com Ca intravenoso a recorrência após o primeiro tratamento é de 30% a 35% (Rajala, 1998, citado por Thilsing-Hansen et al., 2002).

Quando adicionado ao tratamento uma a duas doses orais de Ca, este tem um efeito preventivo na recorrência de 60% (Thilsing-Hansen et al., 2002).

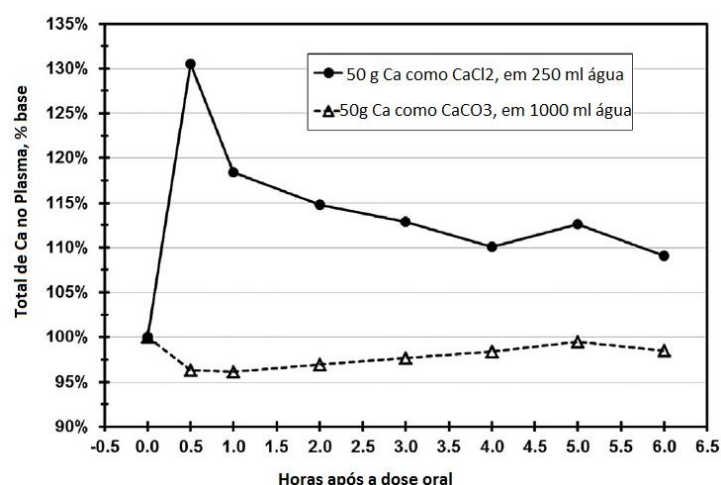


Figura 2. 7 Figura adaptada de Oetzel, 2013. Efeito do cloreto de Cálcio oral e carbonato de Cálcio oral no Cálcio plasmático, expresso em percentagem de valor base.

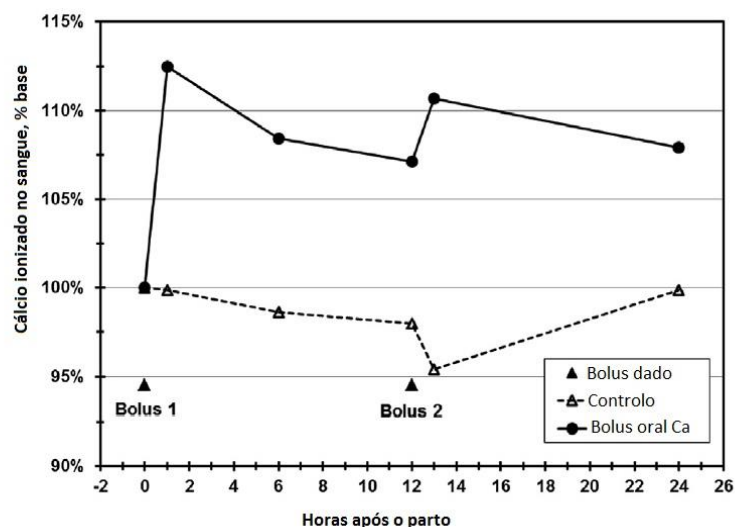


Figura 2. 8 Figura adaptada de Oetzel, 2013. Efeito da administração de dois bolus de Bovicalc no cálcio plasmático.

2.7.4 Cálcio Subcutâneo e Intramuscular

O Ca subcutâneo pode ser usado para suportar a concentração de Ca no sangue perto do parto, tendo limitações substanciais (Goff, 1999).

A absorção de Ca de administrações subcutâneas requer uma perfusão periférica adequada, podendo não ser eficaz em vacas com hipocalcemia severa ou desidratadas (Oetzel, 2012).

As injeções subcutâneas de Ca são irritantes e pode provocar a necrose dos tecidos, devendo ser limitada a no máximo 75mL de uma solução de gluconato de Ca a 23%, ou seja, 1,5g de Ca elementar, por local de injeção (Oetzel, 2012). As soluções de Ca que também contêm glucose não devem ser administradas por esta via, pois a glucose é mal absorvida por esta via provocando abscessos (Oetzel, 2012).

A cinética do Ca quando administrado no subcutâneo indica que inicialmente é bem absorvido, mas a concentração no sangue desce novamente passadas 6 horas, o que indica que tratamentos repetidos seriam necessários para igualar o efeito dos bolus orais de Ca (Goff, 1999; Oetzel, 2012) (Figura 2.9).

Também existem preparações para administração de Ca intramuscular, normalmente sobre a forma de levulinato de Ca e lactato de Ca, sendo menos lesivo para os tecidos e também mais caro, deve ser limitado a 0,5 a 1,0g por local de injeção, para um tratamento efetivo deve ser administrado um total de 6 a 10 injeções em locais muito afastados (Goff, 1999).

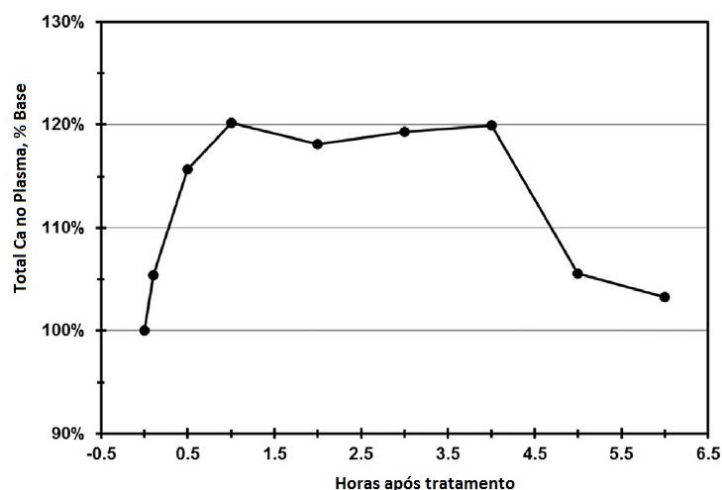


Figura 2. 9 Figura adaptada de Oetzel, 2013. Efeito de uma administração subcutânea de 500mL a 23% de uma solução boroglucanato de Cálcio (10,5g de Ca) no Ca plasmático, expresso em porcentagem de valor base.

2.7.5 Naloxona

Segundo Sciorsci, Dell'Aquila e Minoia (2001), a naloxona, um antagonista opióide, em associação com sais de Ca, diminui significativamente o número de vacas que necessitam de tratamentos repetidos e não se observam vacas que não respondem ao tratamento.

2.8 Prevenção

“O potencial para manipular a incidência é indicado pela diferença de incidências entre explorações.” (DeGaris & Lean, 2008, p.59)

A manipulação da incidência parte dos mecanismos de prevenção aplicados por cada exploração, Lean et al. (2006) suporta esta observação visto que dos 135 ensaios controlados a média era de 21% mas com um intervalo de 0-83%.

Foi proposto que um programa específico de controlo é relevante quando a incidência de hipocalcémia clínica se encontra acima dos 10% nas vacas de alto risco ($\geq 3^a$ Lactação) (Radostits, Gay, Blood, & Hincliff, 2000).

Vários princípios de controlo da hipocalcémia têm sido descritos na literatura dos últimos 50 anos, por várias razões apenas quatro destes são usados amplamente em vacarias comerciais (Thilsing-Hansen et al., 2002), sendo estes:

2.8.1 Dietas pobres em cálcio

Este princípio é baseado na teoria de prevenir que os mecanismos de homeostasia do Ca fiquem quiescentes durante o período seco (Thilsing-Hansen et al., 2002).

A necessidade de Ca da vaca seca é muito baixa, cerca de 43g/dia por 500kg de peso nos últimos dois meses de gestação (Eastridge, Bucholtz, Slater, & Hall, 1998). A maioria das rações para vacas contêm valores consideravelmente maiores, como o Ca excede os valores necessários, os mecanismos de homeostasia do Ca ficam inativos (Horst, Goff, & Reinhardt, 1994).

Ao alimentar as vacas com uma dieta com pouco Ca (< 20 g/d) no período seco, os mecanismos de homeostasia de Ca são ativados antes do parto, assim a vaca é capaz de absorver o Ca de forma mais eficiente no intestino, assim como utilizar o Ca dos ossos pela altura do parto (Kichura, Horst, Beitz, & Littledike, 1982).

Com base em alguns estudos Green, Horst, Beitz, e Littledike (1981) e Kichura, Horst, Beitz, e Littledike (1982) foi determinado que o período necessário de exposição a uma ração pobre em Ca de forma a ser obtido um bom efeito preventivo, é de 14 dias ou mais.

O princípio da dieta com baixo Ca é muito efetivo, aproximando-se dos 100% na prevenção da hipocalcemia clínica, quando nos termos acima descritos (Thilsing-Hansen et al., 2002).

2.8.2 Dieta com baixa diferença entre cátions-aniões

Inicialmente, foi proposto por Shohl e Sato em 1922 que os minerais estavam relacionados com o equilíbrio ácido-base, tendo colocado como hipótese que um excesso no consumo, quer de um cátion ou de um anião, resultaria em distúrbios ácido-base. Mais tarde foi demonstrado por Ender *et al.* (1971) e Dishington (1975) citado por Goff (2014) que com a redução da DCAD, definida como a diferença entre cátions (primariamente potássio $[K^+]$ e sódio $[Na^+]$) e aniões (primariamente cloreto $[Cl^-]$ e Sulfato $[SO_4^{2-}]$) na dieta utilizada no pré-parto, melhora a homeostasia do Ca no começo da lactação (Goff, 2014).

Em teoria todos os cátions e aniões na dieta são capazes de influenciar a carga elétrica do sangue. Os cátions mais presentes na dieta e as suas respectivas cargas são Na (+1), K (+1), Ca (+2) e Mg (+2), já os aniões cloro Cl (-1), SO_4 (-2) e fosfato PO_4 (-3) (Goff, 2014).

A adição de aniões na dieta de forma a contrariar os catiões nela presentes reduzem a alcalinidade do sangue, recuperando desta forma a resposta dos tecidos-alvo à HPT (Goff, 2014).

Ao manter uma DCAD abaixo de zero a incidência de hipocalcémia é reduzida, encontrando-se abaixo dos 20%, já com uma alta DCAD a incidência de hipocalcémia encontra-se entre 0% e os 80%. (Thilsing-Hansen et al., 2002).

A utilização destes sais deve ser realizada de 21 a 45 dias, podendo-se reduzir para um mínimo de 10 dias de utilização no pré-parto (Thilsing-Hansen et al., 2002).

O uso de aniões para reduzir a DCAD está limitado por problemas com a palatibilidade dos sais aniônicos normalmente utilizados (G R Oetzel & Barmore, 1993), diminuindo com isto, segundo alguns estudos como Oetzel e Barmore (1993), a ingestão de matéria seca.

2.8.2.1 Monitorizar o pH da urina

A resposta aos aniões adicionados à dieta pode ser avaliada pelo pH da urina, visto este nos dar uma previsão bastante precisa do pH sanguíneo (Gregghi, Netto, Silva, & Marcus Antonio Zanetti, 2014; Seifi, Mohri, & Kalamati Zadeh, 2004). Para um ótimo controlo da hipocalcémia subclínica o pH urinário deve-se encontrar entre os 6,2 e 6,8 na última semana de gestação, não podendo descer dos 5,5, o que caso aconteça indica uma excessiva adição de aniões à dieta, podendo causar uma acidose metabólica descompensada. A medição do pH da urina deve ser avaliado 72 horas após a alteração da alimentação, devendo ser recolhidas 6 a 9 horas após a comida ser oferecida, mais regularmente na última semana de gestação (Goff, 2014).

2.8.3 Administração de cálcio oral perto do parto

O programa profilático envolve normalmente quatro doses (Thilsing-Hansen et al., 2002). A administração oral de Ca deve preferencialmente fornecer Ca^{2+} , de forma a ser absorvido de forma mais rápida (Thilsing-Hansen et al., 2002).

Em ensaios como Jönsson e Pehrson (1970), Simesen e HyldgaardJensen (1971) e Oetzel (1996) citados por Thilsing-Hansen et al. (2002) foram administradas 3 a 10 doses de cloreto de Ca sob a forma de um gel solúvel em água, tendo um efeito preventivo de aproximadamente 50 a 55%. Administração de 4 doses de cloreto de Ca e sulfato de Ca têm

uma eficácia um pouco maior de 73% (Pehrson et al., 1989, citado por Thilsing-Hansen et al., 2002).

O cloreto de Ca em pasta foi reportado como tendo um efeito preventivo de 70% em duas investigações (Agger et al., 1997, Agger, 1998, citados por Thilsing-Hansen et al., 2002). O Ca em pasta de propionato tem uma eficácia de 30% (Goff, Horst, Jardon, Borelli, & Wedam, 1996).

A eficácia do uso de duas doses na prevenção é uma prática muito usada, mas ainda não documentada (Thilsing-Hansen et al., 2002).

A maioria dos programas preventivos como os documentados anteriormente, envolvem uma administração de três a quatro doses distribuídas uniformemente durante o período 12 a 24 horas antes do parto, até 24 horas depois do parto (Jönsson & Pehrson 1970, Pehrson et al. 1989, Goff et al. 1996, Oetzel 1996, Agger et al. 1997, citados por Thilsing-Hansen et al., 2002).

2.8.4 Administração de Vitamina D, os seus metabolitos e análogos no pré-parto

O uso de largas doses de metabolitos de vitamina D e análogos para prevenção da hipocalcemia clínica é controverso (Thilsing-Hansen et al., 2002). A eficácia varia muito entre estudos e a dose necessária está muito perto da dose tóxica, causando sintomas clínicos (Littledike & Horst, 1982) incluindo anorexia, perda de condição corporal, dispneia, taquicardia e apatia (Radostits et al., 2000), podendo mesmo causar uma calcificação metastática irreversível dos tecidos moles (Goff, 2008).

Outro potencial problema é que a vaca aparentemente se torna dependente da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ exógena, por supressão da produção endógena, podendo mostrar sinais de hipocalcemia clínica 10 a 14 dias pós-parto (Goff, Horst, Beitz, & Littledike, 1988).

A altura da administração é muito importante, otimamente dada 2 a 8 dias antes do parto. Caso a vaca não tenha parido passados 8 dias desde a última administração, pode-se fazer outra administração repetindo-se de 8 em 8 dias até ao parto (Radostits et al., 2000), embora não seja recomendado pelos produtores destes produtos o uso de mais de duas doses por vaca (Thilsing-Hansen et al., 2002).

Apesar destes inconvenientes, a injeção de Vitamina D3 continua o método mais comumente utilizado para a prevenção da hipocalcemia, principalmente devido à sua simplicidade (Radostits et al., 2000).

Um estudo (Yamagishi et al., 2000) comparou o efeito de uma mesma dose de vitamina D₃ administrada oralmente pós-ruminal e por injeção intramuscular e observou-se que a administração oral teve um maior potencial na prevenção da hipocalcemia.

2.8.5 Outros princípios de controle

Outros princípios podem ser adotados como o controle do Mg no periparto devido a sua importância, controle da condição corporal, controle da ingestão de carboidratos na dieta periparto, encurtar o período seco pois o tempo excessivo leva ao aumento do peso (Thilsing-Hansen et al., 2002).

A administração de Ca intravenoso como prevenção está contraindicada, com base em estudos recentes leva a vaca a níveis de hipercalcemia (pico 1 hora após administração), descendo no ‘*nadir*’ para valores hipocalcêmicos (Blanc et al., 2014).

2.9 Consequências da Hipocalcemia

A ocorrência de hipocalcemia clínica está relacionada com o aumento da incidência de outras afeções que ocorrem no período de transição. Como exemplo temos a mastite, distócia e deslocamento de abomaso que têm respectivamente 8, 3 e 2 a 4 vezes mais probabilidade de se desenvolver caso a hipocalcemia esteja instalada (Mulligan et al., 2006).

Mulligan et al. (2006) dividiu as consequências da hipocalcemia em fisiológicas e clínicas, estando estas sempre relacionadas (Figura 2.10):

2.9.1 Consequências Fisiológicas

Recentemente foi descrito que a hipocalcemia exacerba o nível de imunossupressão experienciado perto do parto (Kimura, Reinhardt, & Goff, 2006), julga-se que o cortisol é um importante componente na imunossupressão e demonstrou-se que a hipocalcemia causa um aumento no cortisol na altura do parto.

Sabe-se também que a hipocalcemia reduz a habilidade da vaca no período de transição de realizar a contração do músculo liso e esquelético (Mulligan et al., 2006).

2.9.2 Consequências Clínicas

2.9.2.1 Distocia e Prolapso Uterino

A habilidade reduzida de contração do músculo liso e esquelético compromete o parto, evidência disso são estudos que indicam um aumento de 6 vezes mais casos de distocia em vacas que sofrem de hipocalcemia (Curtis et al., 1983), outros indicam 2,5 a 3 vezes mais casos (Correa, Erb, & Scarlett, 1993; Erb et al., 1985).

Vacas que sofrem prolapsos do útero têm uma baixa concentração sérica de Ca quando comparadas com vacas normais (Risco, Reynolds, & Hird, 1984).

2.9.2.2 Retenção de Placenta

O efeito direto da hipocalcemia na retenção de placenta (excluindo os casos de distocia) é de duplicar a sua ocorrência (Erb et al., 1985). Já o efeito indireto é aumentar a incidência de distocia que, por sua vez, é um fator de risco para a retenção de placenta (Correa et al., 1993).

Recentemente Melendez, Donovan, Risco e Goff (2004) reportaram uma concentração sérica de Ca significativamente mais baixa em vacas com retenção das membranas fetais, quando comparadas com vacas que expulsaram a placenta normalmente.

2.9.2.3 Endometrite

As ligações previamente abordadas entre a hipocalcemia, distocia e retenção de placenta juntamente com a ligação entre a hipocalcemia e imunossupressão no periparto, fornece uma sustentação sólida para a associação entre a hipocalcemia e endometrite (Kimura et al., 2006).

2.9.2.4 Fertilidade

Em muitos casos de baixa fertilidade nas explorações não é considerada a possibilidade da hipocalcemia ser um fator predisponente (Mulligan et al., 2006).

A hipocalcemia reduz diretamente a fertilidade pelo seu efeito na função muscular uterina, por provocar uma involução uterina mais lenta e por reduzir a corrente sanguínea nos ovários (Borsberry & Dobson, 1989; R. C. W. Daniel & Jonsson, 1997). Também todos os pontos anteriormente falados reduzem a fertilidade de forma indireta.

Vacas com hipocalcemia clínica têm o corno uterino grávido e o não grávido com maior diâmetro entre 15 a 45 dias pós-parto, têm também uma probabilidade significativamente mais baixa de desenvolver *corpus luteum* (Iain Martin Sheldon & Whiteford, 2005), têm menos folículos ovulatórios e de menor dimensão aos 15, 30 e 45 dias pós-parto e folículos mais pequenos à primeira ovulação quando comparadas com vacas normais (Kamgarpour, Daniel, Fenwick, Mcguigan, & Murphy, 1999).

A incidência de hipocalcemia seguida de endometrite, e de endometrite após retenção da placenta pode provocar um aumento no intervalo parto-concepção de 66 e 51 dias respetivamente (Borsberry & Dobson, 1989)

2.9.2.5 Mastite

As vacas que sofrem de hipocalcemia têm uma incidência 8 vezes superior do que uma vaca com valores séricos de Ca normais (Curtis et al., 1983).

Julga-se que se deve à redução na função do músculo liso (como anteriormente referenciado) no esfíncter do teto, permitindo a subida da infeção após a ordenha (Goff, 2014) e à imunossupressão exacerbada principalmente nas células mononucleares no sangue periférico, devido às reduzidas reservas de Ca intracelular (Kimura et al., 2006).

2.9.2.6 Função do trato gastrointestinal

Alguns autores como (Daniel, 1983) reportaram uma redução da motilidade no rúmen e abomaso em vacas com hipocalcemia levando provavelmente a uma redução na ingestão de matéria seca, sendo particularmente importante nas vacas de alta produção, visto necessitarem de ingerir grandes volumes de alimento para responder às suas necessidades metabólicas (Mulligan et al., 2006). Este efeito pode ocorrer durante a primeira semana de lactação (Goff & Horst, 1997), o que vai exacerbar o balanço energético negativo, levando a um aumento dos corpos cetónicos, a motilidade reduzida vai também provocar atonia e distensão do abomaso, aumentando desta forma o risco de deslocamento de abomaso (Goff, 2014)

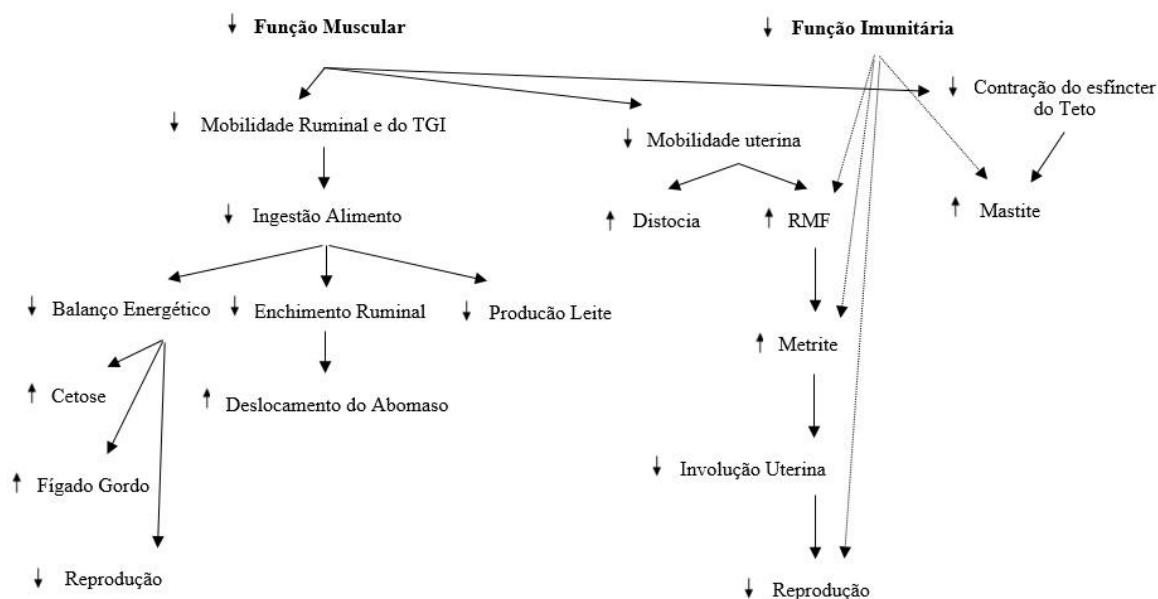


Figura 2. 10 Esquema de Mulligan et al., 2006. Consequências da hipocalcemia clínica e subclínica.

2.10 Impacto económico

É difícil encontrar outro fator que esteja associado a tantas complicações veterinárias com importância económica como a hipocalcemia (Mulligan et al., 2006).

O impacto económico, caso não sejam tomadas medidas preventivas, é enorme devido à diminuição da produção, ao risco do animal ser removido da exploração, à ocorrência de complicações derivadas da hipocalcemia como cetose, deslocamento de abomaso, mastite e metrite, ao tratamento caso se trate de hipocalcemia clínica, para além de todos efeitos que tem na fertilidade.

A hipocalcemia clínica pode reduzir a vida produtiva da vaca em 3,4 anos (Payne 1968, citado por Horst, Goff, Reinhardt, & Buxton, 1997).

A hipocalcemia subclínica é mais dispendiosa do que a hipocalcemia clínica, visto afetar uma percentagem muito maior da população (Oetzel, 2011). Por exemplo numa exploração com 2000 vacas, com uma incidência anual de 2% de hipocalcemia clínica, o tratamento de cada caso custa \$300, a perda total causada pelos casos clínicos é cerca de \$12,000 por ano. Essa mesma exploração tem uma incidência anual de 30% de hipocalcemia subclínica em vacas com duas ou mais lactações (assumindo que são cerca de 65% das vacas da exploração) e que cada caso custa \$125, incluindo a redução de produção e o custo direto devido ao aumento dos corpos cetónicos e deslocamento de abomaso, então as perdas totais

neste caso são de \$48,750 por ano, quatro vezes mais do que a hipocalcemia clínica (Oetzel, 2013)

McArt e Oetzel (2015) publicaram um artigo com uma estimativa do impacto económico nos primeiros 30 dias de lactação da suplementação oral de Ca no pós-parto, no qual comparam quatro estratégias de suplementação de duas doses (2 e 24 horas após o parto) nomeadamente: vacas de alta produção, vacas coxas, vacas com alta produção e coxas e suplementação de todas as vacas, o retorno que se verificou foi de 1,1 para 1; 6,5 para 1; 1,8 para 1; e 0,3 para 1 respetivamente.

Capítulo III – Materiais e Métodos

3.1 Tipo de estudo

Trata-se de um ensaio clínico.

3.2 Questão de investigação

Qual o efeito da administração oral de cálcio, logo após o parto, nos níveis séricos de cálcio?

3.3 Objetivos

O principal objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da administração oral de Ca, logo após o parto, nos níveis séricos de Ca.

Este estudo teve também como objetivos secundários avaliar a relação dos níveis de Ca com a ocorrência de hipocalcémia clínica, assim como de afeções no pós-parto dependentes desses mesmos níveis.

3.4 Contexto do estudo

3.4.1 Exploração e período de estudo

Este estudo foi realizado numa exploração no Ribatejo e decorreu no período de 16 de junho de 2015 a 31 de Outubro de 2015.

A exploração é constituída por cerca de 220 vacas à ordenha, encontrando-se em parques, divididos por grupos consoante a sua fase de produção, todos estes cobertos e ventilados, tendo acesso permanente ao exterior assim como a água, eram realizadas três ordenhas por dia e a comida fornecida duas vezes ao dia, sendo esta preparada na exploração.

Relativamente ao tema abordado, desconhece-se a situação atual referente à hipocalcémia na exploração em estudo. Esta como prevenção, administra um frasco 500 mL de Ca intravenoso nas múltiparas, não administra dietas aniónicas e o tratamento preconizado, numa situação de hipocalcémia clínica, é um frasco de 500 mL de Ca intravenoso.

3.4.2 Amostra

O estudo incluiu 41 vacas selecionadas através de uma amostragem aleatória estratificada e divididas em dois grupos: um de controlo (n=21) e o grupo de tratamento (n=20). O tamanho da amostra foi definido pelo orçamento para financiamento do estudo,

quer pela disponibilidade de produto para o estudo, quer pelo pagamento do processamento das amostras.

Relativamente ao grupo de tratamento, ao longo do trabalho será mencionado como grupo Bovikalc.

3.4.2.1 Critérios de inclusão

Disponibilidade de multíparas a parirem com data de parto prevista duas a duas (uma para cada grupo), com a mesma paridade.

Foram privilegiadas vacas com maior número de lactações, pois como referido no capítulo anterior, o risco de hipocalcémia clínica aumenta 9% por lactação (Lean et al., 2006).

3.4.2.2 Caracterização da amostra

O número de lactações das vacas que participaram no estudo é um dado importante pois está diretamente correlacionado com a ocorrência de hipocalcémia (Horst, Goff, & Reinhardt, 1990). Desta forma, esta tabela descreve o número de lactações das vacas presentes no estudo.

Lactações	Nº de Vacas
2	1
3	15
4	14
5	8
6	2
7	1

Tabela 3. 1 Número de lactações das vacas presentes no estudo.

3.5 Desenho experimental

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, o documento encontra-se no anexo 2.

Grupo de controlo: Após o parto foi retirada uma amostra de sangue na veia coccígea média, sendo em seguida administrado um frasco de 500 mL de Ca intravenoso. A amostra foi centrifugada, o plasma separado, devidamente etiquetado e congelado. Posteriormente foi enviado para o laboratório com o objetivo de quantificar o Ca. Passadas 24 horas uma nova recolha foi feita, processada e enviada.

Grupo de tratamento: Após o parto foi retirada uma amostra de sangue na coccígea, sendo em seguida administrado um frasco de 500 mL de Ca intravenoso e dois bolus orais de Ca (Bovikalc). A amostra foi centrifugada, o plasma separado, devidamente etiquetado e congelado. Posteriormente foi enviado para o laboratório com o objetivo de quantificar o Ca. Passadas 24 horas uma nova recolha foi feita, processada e enviada.

3.6 Recolha e tratamento das amostras

As amostras foram retiradas na coccígea para um tubo próprio asséptico, foram em seguida centrifugadas, o plasma separado para um tubo tipo Eppendorf, devidamente etiquetado e congelado. Posteriormente a amostra foi enviada para o laboratório num contentor próprio e mantidas as baixas temperaturas onde finalmente foram processadas da forma descrita a baixo.

A determinação quantitativa *in vitro* de Ca_{total} em soro, plasma e urina, foi realizada com base num método colorimétrico. Utilizou-se a cassette ABX Pentra Calcium AS CP, que com calibrador e controlos associados, é um reagente de diagnóstico. O equipamento utilizado no doseamento de Ca_{total} sérico é o ABX Pentra 400 (HORIBA ABX, France).

O método utilizado aqui baseia-se no metalocromogénio Arsenazo III. Os iões de cálcio reagem com o Arsenazo ao pH 6,75 para formar um cromóforo na coloração púrpura intensa. A absorvância do complexo cálcio-Arsenazo III é medida bicromaticamente a 660/700 nm.

O aumento resultante na absorvância desta mistura da reação é diretamente proporcional à concentração de cálcio presente na amostra. O Arsenazo III possui alta afinidade com os iões de cálcio e não apresenta interferência de outros catiões normalmente presentes no soro, plasma ou urina” (HORIBA ABX, ABX Pentra Calcium AS CP, France, pp.1) o documento da empresa com informação relativa ao processo encontra-se no anexo 3.

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada avaliando e comparando as duas medições dos níveis de cálcio, antes e depois da administração do tratamento preconizado para cada grupo, foram também determinados os efeitos na produção leiteira, utilizando-se nestes casos os parâmetros

descritivos como a média, a mediana e a moda, avaliou-se também a ocorrência de afeções secundárias dependentes dos baixos níveis de cálcio como metrite, mastite e cetose.

Esta análise dos dados e construção de figuras foi possível utilizando o Excel®.

Capítulo IV – Resultados

4.1 Resultados relativos às questões de investigação

4.1.1 Avaliação do efeito da administração oral de Ca, logo após o parto, nos níveis séricos de Ca.

A medição dos níveis séricos de Ca_{total} e respetivas diferenças (consiste na subtração do valor da amostra 2 pelo da amostra 1 e indica a variação dos níveis de Ca) do grupo Bovikalc e de controlo encontram-se nas tabelas 4.1 e 4.2 respetivamente em mg/dL.

Vaca	Amostra1	Amostra2	Dif.
1	3,18	6,06	2,88
2	7,35	6,33	-1,02
3	7,27	6,75	-0,52
4	5,55	5,87	0,32
5	6,45	5,18	-1,27
6	7,88	7,94	0,06
7	6,9	4,34	-2,56
8	8,17	7,28	-0,89
9	8,2	8,5	0,3
10	7,34	8,38	1,04
11	4,92	7,63	2,71
12	8,18	5,33	-2,85
13	3,42	4,1	0,68
14	5,9	6,75	0,85
15	6,78	6,5	-0,28
16	6,45	5,62	-0,83
17	7,26	8,59	1,33
18	7,42	8,11	0,69
19	7,15	5,46	-1,69
20	7,35	7,95	0,6

Tabela 4. 1 Medições dos níveis de Ca do grupo de Bovikalc e respetiva diferença (mg/dL).

Vaca	Amostra1	Amostra2	Dif.
1	6,94	6,51	-0,43
2	5,94	6,91	0,97
3	6	5,78	-0,22
4	8,08	7,36	-0,72
5	6,71	5,69	-1,02
6	5,67	6,46	0,79
7	8,29	7,29	-1
8	4,99	5,43	0,44
9	6,95	5,75	-1,2
10	8,52	6,19	-2,33
11	5,49	4,58	-0,91
12	7,99	6,33	-1,66
13	8,86	8,39	-0,47
14	9,05	7,53	-1,52
15	7,85	6	-1,85
16	5,39	7,52	2,13
17	5,66	7,14	1,48
18	7,06	7,71	0,65
19	5,4	6,05	0,65
20	8,56	6,64	-1,92
21	8,97	7,8	-1,17

Tabela 4. 2 Medições dos níveis de Ca do grupo de controlo e respetiva diferença (mg/dL).

De forma a resumir a comparação da quantificação do Ca_{total} utilizámos a média dos dois grupos, no grupo Bovikalc (BK) a amostra 1 (BK1) com a média de 6,656 mg/dL e IC (Intervalo de Confiança) 95% [7,33;5,99], na amostra 2 (BK2) com a média de 6,63 mg/dL e IC 95% [7,28;5,99]. No grupo de Controlo a amostra 1 (Controlo1) com a média de 7,07 mg/dL e IC 95% [7,69;6,44], na amostra 2 (Controlo2) com a média de 6,62 mg/dL e IC 95% [7,05;6,19], como se pode ver na tabela 4.3, a comparação das médias está representada de

forma mais intuitiva na figura 4.1. Utilizámos também a média da diferença entre amostras para comparar os dois grupos na tabela 4.4, sendo que no grupo Bovikalc a diferença é de -0,023 mg/dL com IC 95% [0,68;-0,72] e no de controlo -0,443 com IC 95% [0,11;-0,99].

Grupo	Média	Intervalo de confiança	
		Superior	Inferior
BK1	6,656	7,327	5,985
BK2	6,634	7,281	5,986
Controlo1	7,065	7,693	6,438
Controlo2	6,622	7,049	6,194

Tabela 4. 3 Resultados da análise descritiva das medições dos níveis de Ca, da 1ª e 2ª medições do grupo Bovikalc e de controlo (em mg/dL).

Grupo	Média	Intervalo de confiança	
		Superior	Inferior
BK	-0,023	0,679	-0,724
Controlo	-0,443	0,109	-0,996

Tabela 4. 4 Resultados da análise da diferença entre medições (em mg/dL).

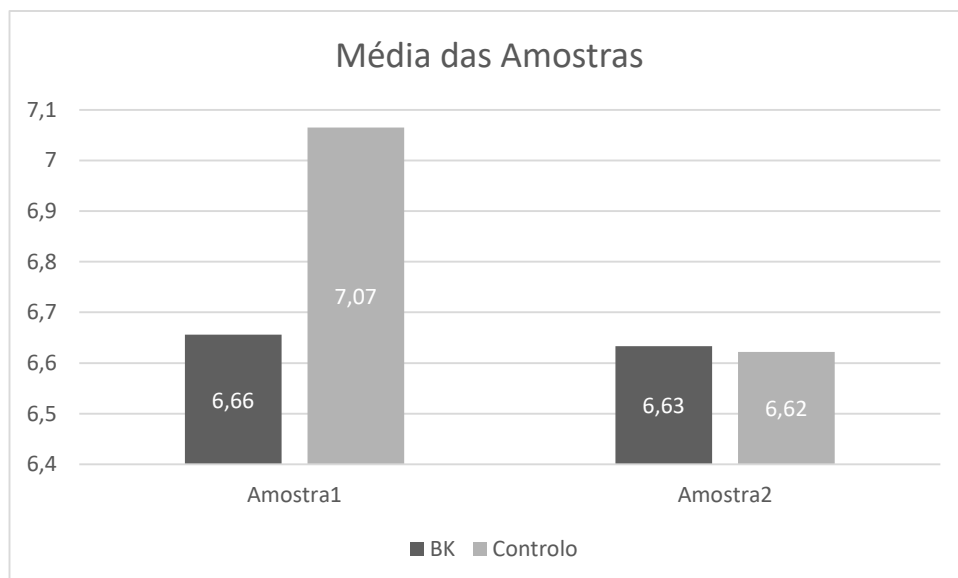


Figura 4. 1 Resultados da análise da média das duas amostras de Ca consoante o grupo e respetiva linha de tendência, em mg/dL.

De forma mais detalhada podemos observar na figura 4.2 todos os valores obtidos no estudo e ter em conta as variações individuais de cada elemento, na amostra 1 (escuro) e na amostra 2 (claro) do grupo Bovikalc do lado esquerdo e do controlo do lado direito.

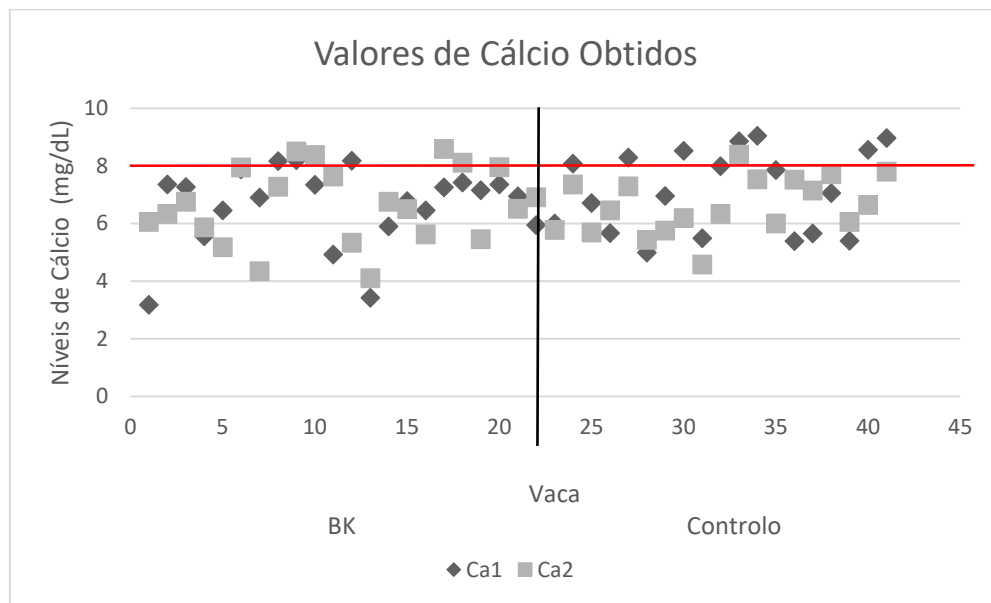


Figura 4. 2 Valores individuais das medições de Ca.

Nos diferentes grupos avaliámos os casos de hipocalémia subclínica ($>5,5$ a 8 mg/dL) e 70% das vacas do grupo Bovikalc encontravam-se em hipocalcémia subclínica na primeira amostra recolhida e 60% na segunda amostra. No grupo de controlo 52.4% das vacas encontravam-se em hipocalcémia subclínica na primeira amostra e 85.7% na segunda, embora os níveis abaixo de hipocalcémia subclínica ($<5,5$ mg/dL) tenham aumentado no grupo Bovikalc, passando de 15% para 20% , enquanto que no grupo controlo passou de 14,3% para 9,5%.

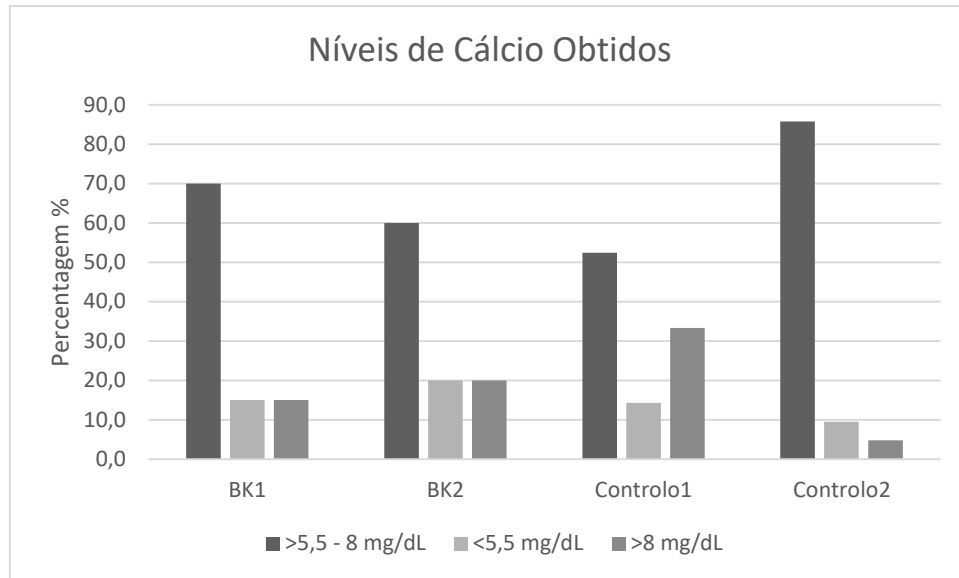


Figura 4. 3 Níveis de Ca obtido nos diferentes grupos.

Embora o objetivo do estudo fosse a avaliação do efeito da administração de Ca oral após o parto, foi possível também avaliar a situação da exploração em relação à hipocalcemia, na qual do grupo Bovikalc na amostra 1 apenas 15% se encontrava com os valores normais de Ca_{total} (acima de 8,0 mg/dL), subindo na amostra 2 para os 20%. Já no grupo de controlo a tendência inverte-se, começando na amostra 1 com 33,3% com valores de Ca_{total} normais, descendo para os 4,8% na amostra 2, conforme a figura 4.3.

4.1.2 Avaliação da relação dos níveis de Ca com a ocorrência de hipocalcemia clínica, assim como de alterações no pós-parto dependentes desses mesmos níveis.

Surgiram três casos de hipocalcemia clínica durante o estudo, sendo que dois foram no grupo Bovikalc, que representa 10% do grupo e um no grupo de controlo que representa 4,8% do grupo, o que no total da amostra representa 7,3%.

Relativamente a alterações no pós-parto na produção de leite, a média do grupo Bovikalc foi de 4337,5L com IC 95% [4643,6;4031,4], já no de controlo foi de 4179,5L com IC 95% [4348,8;4010,3], conforme se encontra na tabela 4.5.

Grupo	Média	Intervalo de confiança	
		Superior	Inferior
BK	4337,5	4643,628	4031,372
Controlo	4179,5	4348,765	4010,288

Tabela 4. 5 Resultados da análise da produção de leite aos 100 dias, em Litros L.

As mastites foram diagnosticadas no controlo pós-parto avaliando as médias de produção, caso desçam, assim como por avaliação dos tetos na ordenha pelos ordenhadores. Após suspeita realização do teste Californiano de mastites (TCM) (Sargeant et al., 2001).

No caso das mastites foi avaliada a sua frequência nos diferentes grupos, sendo que dos 49% (20 vacas) negativos, 22% (9 vacas) eram do grupo Bovikalc e 27% (11 vacas) do grupo de controlo, já nos casos positivos de mastites dos 51% (21 vacas), 27% (11 vacas) eram do grupo Bovikalc e 24% (10 vacas) do grupo de controlo, conforme se verifica na figura 4.4.

A frequência por grupo foi de 55% no grupo Bovikalc e 47,6% no de controlo, tendo no total sido de 51,2%.

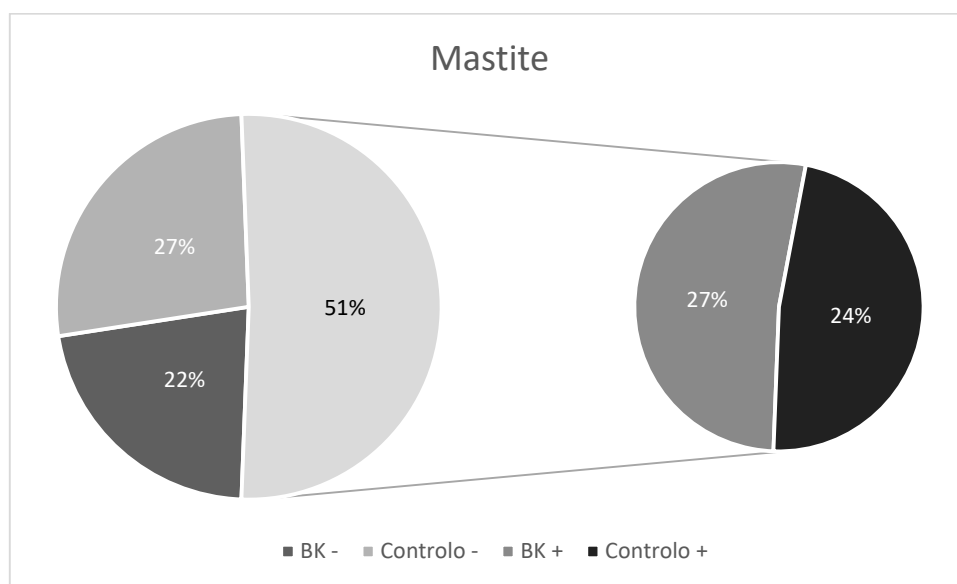


Figura 4. 4 Distribuição da frequência relativa da ocorrência ou não de mastite no grupo de controlo e Bovikalc.

As metrites foram diagnosticadas no controlo pós-parto por avaliação de sinais sistémicos como hipertermia, de existência de descargas vaginais, por palpação e avaliação da involução uterina (Sheldon et al., 2009).

Já nas metrites a sua frequência foi também avaliada nos diferentes grupos, sendo que dos 88% (36 vacas) negativos, 46% (19 vacas) eram do grupo Bovikalc e 42% (17 vacas) eram do grupo de controle. Nos casos positivos de mastites dos 12% (5 vacas), 2% (1 vaca) era do grupo Bovikalc e 10% (4 vacas) do grupo de controle, conforme se verifica na figura 4.5.

A frequência por grupo foi de 5% no grupo Bovikalc e 19% no de controle, tendo no total sido de 12,2%.

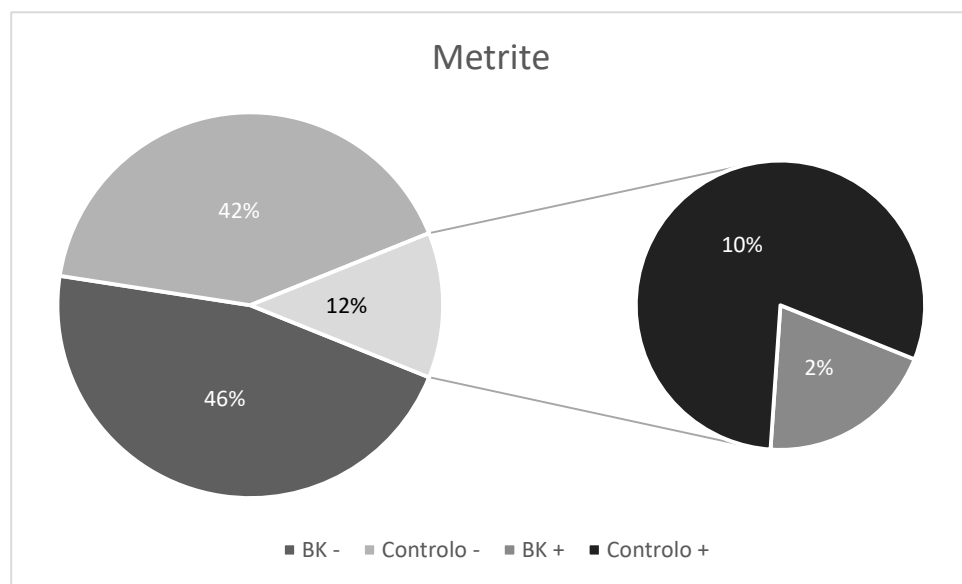


Figura 4. 5 Distribuição da frequência relativa da ocorrência ou não de metrite no grupo de controle e Bovikalc.

Já na cetose a sua frequência foi também avaliada nos diferentes grupos, sendo que dos 95% (39 vacas) negativos, 49% (20 vacas) eram do grupo Bovikalc e 46% (19 vacas) eram do grupo de controle. Relativamente aos casos positivos de mastite dos 5% (2 vacas), 0% (nenhuma vaca) era do grupo Bovikalc e 5% (2 vacas) do grupo de controle, conforme se verifica na figura 4.6.

A frequência por grupo foi de 0% no grupo Bovikalc e 9,5% no de controle, tendo no total sido de 4,9%.

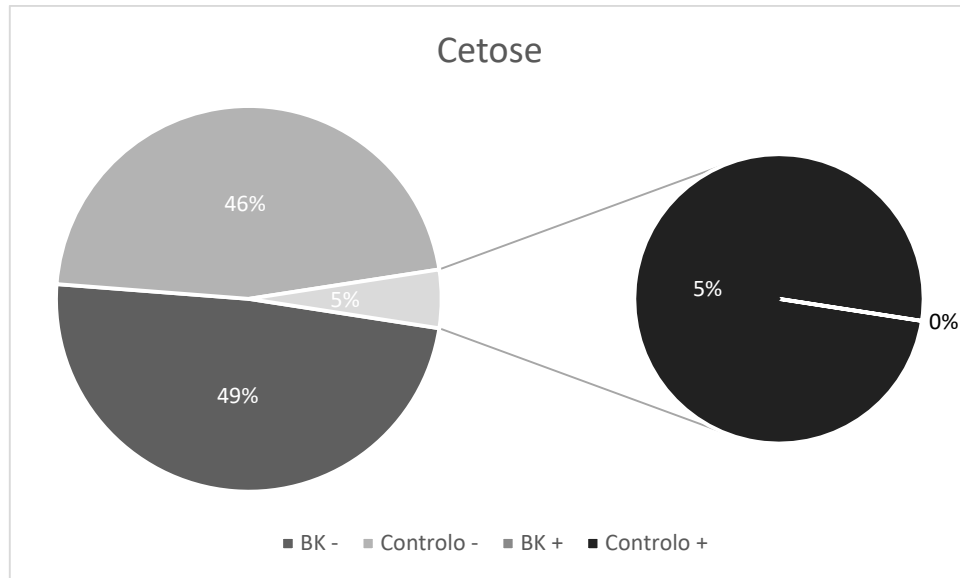


Figura 4. 6 Distribuição da frequência relativa da ocorrência ou não de cetose no grupo de controlo e Bovikalc.

A frequência de cetose acima mencionada foi calculada com base nos valores medidos de β -hidroxibutirato, trazendo-nos desta forma às alterações no pós-parto nos valores de β -hidroxibutirato. A média do grupo Bovikalc foi de 0,71 mg/dL com IC 95% [0,85;0,57], já no de controlo foi de 0,845 mg/dL com IC 95% [1,18;0,51], conforme se encontra na tabela 4.6.

Grupo	Média	Intervalo de confiança	
		Superior	Inferior
BK	0,71	0,849	0,571
Controlo	0,845	1,181	0,508

Tabela 4. 6 Resultados da análise das medições de β -hidroxibutirato, em mg/dL.

Capítulo V - Discussão

5.1 Respostas às questões de investigação

Apenas uma amostra da população foi trabalhada neste estudo, esta por ser pequena limitou em muito a análise possível, restringindo-o a uma análise descritiva.

A etiologia da hipocalcémia deve-se à falha dos mecanismos de homeostasia do Ca, que com a produção de leite e colostro não conseguem manter os níveis de Ca no sangue (Goff, 2014).

A literatura aponta como principais mecanismos de prevenção, a administração de dietas pobres em cálcio (Kichura et al., 1982), a administração de dietas com baixa DCAD, a administração de cálcio oral perto do parto e a administração de vitamina D, os seus metabolitos e análogos no pré-parto (Thilsing-Hansen et al., 2002). Visto nenhum destes mecanismos ser aplicado na exploração em estudo, estão desta forma reunidas as condições para que a exploração tenha um maior número de casos.

Desta forma surge a importância de avaliar um protocolo de prevenção para eventual aplicação na exploração, nomeadamente a avaliação da administração de Ca oral.

5.1.1 Avaliação do efeito da administração oral de Ca, logo após o parto, nos níveis séricos de Ca.

A administração de Ca oral na altura do parto, não subiu os níveis de Ca_{total} mas possivelmente preveniu a sua descida mais acentuada quando comparados o grupo Bovikalc e o de controlo. Apenas uma minoria das vacas tem valores acima dos 8,0 mg/dL (Goff, 2014) como podemos ver a linha vermelha na figura 4.2.

Relativamente aos casos de hipocalcémia subclínica ($>5,5$ a 8 mg/dL) (Reinhardt et al., 2011), ocorreu uma pequena descida nos casos no grupo Bovikalc, já no grupo de controlo ocorreu uma subida acentuada dos casos. Ambos os grupos com valores muito superiores aos vários estudos existentes, nos Estados Unidos (Reinhardt et al., 2011) e Portugal (Koch, 2013) em que se encontrava hipocalcémia subclínica em 41% e 45,5% dos grupos estudados respetivamente.

Estes resultados de forma geral com níveis de Ca_{total} muito baixos, devem-se provavelmente à não aplicação por parte da exploração de protocolos de prevenção da hipocalcémia. Devendo estes ser aplicados em simultâneo com o objetivo de um maior efeito preventivo (Thilsing-Hansen et al., 2002).

Os resultados podem também variar com a altura de recolha da amostra, em que neste estudo todas as segundas amostras foram recolhidas no nadir, ou seja, 12 a 24 horas após o parto, o que não aconteceu em Reinhardt et al. (2011) em que as amostras foram recolhidas até 48 horas após o parto, podendo nesta fase ocorrer uma normalização desses mesmos níveis, a idade vai também influenciar visto que o grupo foi selecionado de forma a ter o maior número de lactações, o que segundo Lean, DeGaris, McNeil, & Block (2006) aumenta os casos de hipocalcémia.

Segundo Sampson et al., 2009 a administração de bolus de Ca oral aumenta os níveis de Ca_{total} em 8,2% comparativamente ao grupo de controlo. O uso de dietas com baixa DCAD por Sampson et al., 2009 é provavelmente a causa de não se observar o mesmo resultado.

5.1.2 Avaliação da relação dos níveis de Ca com a ocorrência de hipocalcémia clínica, assim como de alterações no pós-parto dependentes desses mesmos níveis.

Verificaram-se pequenas diferenças na variação dos níveis de Ca_{total} nos dois grupos, esta pequena diferença dificulta a respetiva comparação da ocorrência de alterações no pós-parto, logo ao realizar esta comparação temos de ter em conta que os valores não apresentaram grande discrepância, no entanto permite esclarecer a situação da exploração relativamente à ocorrência dessas alterações.

Relativamente aos casos de hipocalcémia clínica surgiram em 10% do grupo Bovikalc e 4,8% do grupo de controlo, no total surgiu em 7,3% das vacas em estudo. Não foram observadas grandes diferenças entre grupos, embora também não existam diferenças nos níveis de Ca que justificasse essa diferença, no entanto um valor total alto quando comparado com a literatura em que DeGaris & Lean (2008) nos Estados Unidos 3,45%, na Austrália 3,5%, mas próximo dos valores Europeus deste estudo 6,17%. É importante referir que os valores obtidos em algumas explorações presentes no estudo de DeGaris & Lean (2008) incluem o resultado total que obtivemos.

O efeito preventivo esperado seria de cerca de 73% no estudo de Pehrson et al., 1989 citado por Thilsing-Hansen et al., 2002, no qual a incidência de hipocalcémia clínica se encontrou nos 14,6% no grupo de tratamento e 54,8% no grupo de controlo. Estes valores não corresponderam aos encontrados, sendo provavelmente uma das razões o uso de apenas duas doses.

A hipocalcemia está também relacionada com quebras na produção, com o aumento de incidência de outras afeções puerperais (Mulligan et al., 2006). Esta quebra de produção referida por Mulligan et. al (2006) é ao longo da lactação.

Ao nível da média de produção de leite nos primeiros 100 dias, assim como aos níveis de Ca_{total} não se verificou uma diferença significativa entre grupo Bovikalc e grupo de controlo, não podendo desta forma serem retiradas conclusões. A hipocalcemia não é um fator de risco na diminuição da produção de leite (Østergaard & Larsen, 1999), produzindo mesmo em média, mais 5,7 kg por dia de leite nas primeiras semanas de lactação (Jawor, Huzzey, LeBlanc, & von Keyserlingk, 2012). O que também não foi possível verificar visto não existirem diferenças significativas nos níveis de Ca_{total} entre os grupos.

Os casos de mastite surgiram em 55% do grupo Bovikalc, 47,6% no de controlo, tendo no total 51,2%. Não foi observada grande diferença entre grupos, embora também não existam diferenças nos níveis de Ca que justificassem essa diferença, na literatura está descrito que vacas que sofrem de hipocalcemia têm uma incidência até 8 vezes superior de mastite (Curtis et al., 1983). Na exploração são feitos o pré e pós ‘dipping’, a comida está na manjedoura após as vacas serem ordenhadas, de forma a não se deitarem logo ainda com o esfíncter do teto dilatado, na seca usam-se consoante a história de mastite antibiótico e em todas o selante intramamário. Os casos totais de mastite encontram-se acima do descrito, valor que ronda os 40% (Bradley, 2002).

Neste estudo observou-se a presença de metrite em 5% do grupo Bovikalc e 19% no de controlo, tendo no total 12,2%. Encontrando-se uma ligeira diferença entre os dois grupos. Os casos totais encontrados de metrite encontram-se abaixo do descrito na literatura que indica que pode ocorrer até aos 40% (Sheldon et al., 2009).

Relativamente à cetose esta ocorre apenas 9,5% do grupo de controlo, não ocorrendo no grupo Bovikalc, representando no total 4,9%. Este é calculado nas medições de β -hidroxibutirato quando este é superior a 1,4 mg/dL indica que há risco de cetose clínica (Duffield et al. 2009). As medições foram na sua grande maioria valores normais e abaixo dos 1,4 mg/dL. Não foi registado nenhum caso de deslocamento de abomaso. Valor abaixo da prevalência mundial de 8,9% a 34% (Duffield, 2000) e deve-se ao controlo alimentar rigoroso presente na exploração, assim como à aplicação do Kexxtone® quando se mudam para o pré-parto.

5.1.3 Situações que dificultaram o estudo

O facto de a amostra ser pequena, dificultou muito a análise dos dados, para além disso a exploração não tinha em prática nenhum protocolo de prevenção da hipocalcémia, por essa razão a diferença não foi acentuada, impedindo também a avaliação consequente das alterações pós-parto nos dois grupos.

5.1.4 Alternativas ao estudo e outros estudos pertinentes

Com base no que foi referido no ponto anterior para um estudo mais completo e do qual fosse possível realizar um análise completa, este necessitava de uma amostra consideravelmente maior, retirar a administração de Ca intravenoso e aplicar um dos protocolos de prevenção, o mais indicado seria dietas aniónicas. Acentuando dessa forma a diferença entre os grupos.

Outros estudos para aprofundar a abordagem a este ponto seria a administração de mais doses de Ca oral nomeadamente quatro doses, que maximiza o efeito preventivo (Thilsing-Hansen et al., 2002) e avaliar o seu efeito, outro estudo para comparar o efeito de diferentes formas orais de Ca. Seria também interessante realizar um estudo avaliando a aplicação de diferentes mecanismos de prevenção, principalmente a aplicação de dietas aniónicas.

Conclusão

Apesar de pequena a amostra, foi possível concluir que a administração de Ca oral logo após o parto evitou a descida acentuada dos níveis de Ca_{total} . Foi possível também concluir que o uso apenas de duas doses de Bovikalc não foi suficiente para reverter os níveis de Ca_{total} para valores normais, tendo desta forma de realizar simultaneamente outro mecanismo de prevenção ou mais doses de Ca oral. Relativamente às afeções secundárias não foi possível tirar conclusões visto a diferença dos níveis de Ca_{total} nos dois grupos não ser significativa, sendo apenas possível observar a situação atual da exploração relativamente à ocorrência dessas alterações, em que se observou um maior número de casos de mastite e hipocalcemia clínica do que os estipulados pela bibliografia.

Concluimos também que apesar de ser muitas vezes negligenciada, a situação da exploração relativa aos níveis de Ca_{total} é muito importante, pois está associada a muitas complicações veterinárias e com importância económica.

Este estudo foi o culminar de todo o conhecimento adquirido, para o concluir tive de recorrer ao uso de ferramentas dominadas durante o curso, que na minha opinião são bem mais importantes do que a informação acumulada. Tratam-se de pesquisa de informação, formas de abordar um tema, desmontá-lo e torná-lo simples, permitindo ao clínico evoluir para além da formatação com que sai da faculdade.

Referências Bibliográficas

- Blanc, C. D., Van der List, M., Aly, S. S., Rossow, H. A., & Silva-del-Río, N. (2014). Blood calcium dynamics after prophylactic treatment of subclinical hypocalcemia with oral or intravenous calcium. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 6901–6. <http://doi.org/10.3168/jds.2014-7927>
- Borsberry, S., & Dobson, H. (1989). Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds. *The Veterinary Record*, 124(9), 217–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2929110>
- Bradley, A. J. (2002). Bovine mastitis: An evolving disease. *Veterinary Journal*, 164(2), 116–128. <http://doi.org/10.1053/tvj.2002.0724>
- Bronner, F. (2009). Recent developments in intestinal calcium absorption. *Nutrition Reviews*, 67(2), 109–113. <http://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2008.00147.x>
- Brown, E. M. (2007). Clinical lessons from the calcium-sensing receptor. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 3(2), 122–133. <http://doi.org/10.1038/ncpendmet0388>
- Butler, W. R. (2000). Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*, 60–61(July 2015), 449–457. [http://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00076-2](http://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00076-2)
- Christakos, S. (2012). Recent advances in our understanding of 1, 25-dihydroxyvitamin D 3 regulation of intestinal calcium absorption. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 523(1), 73–76. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2011.12.020>.Recent
- Correa, M. T., Erb, H., & Scarlett, J. (1993). Path analysis for seven postpartum disorders of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 76(5), 1305–1312. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77461-5](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77461-5)
- Curtis, C. R., Erb, H. N., Sniffen, C. J., Smith, R. D., Powers, P. A., Smith, M. C., ... Pearson, E. J. (1983). Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 183(5), 559–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6618988>

- Daniel, R. C. (1983). Motility of the rumen and abomasum during hypocalcaemia. *Canadian Journal of Comparative Medicine (Gardenvale, Quebec)*, 47(3), 276–280.
- Daniel, R. C. W., & Jonsson, N. N. (1997). Effects of Hypocalcaemia on Blood Flow to the Ovaries of the Sheep. *Zentralbl Veterinarmed A.*, 287, 281–287.
- DeGaris, P. J., & Lean, I. J. (2008). Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles. *Veterinary Journal*, 176(1), 58–69. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.029>
- Doze, J. G., Donders, R., & Kolk, J. H. Van Der. (2008). Effects of intravenous administration of two volumes of calcium solution on plasma ionized calcium concentration and recovery from naturally occurring hypocalcemia in lactating dairy cows. *Am J Vet Res*, 69(10).
- Drackley, J. K. (1999). Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? *Journal of Dairy Science*, 82(11), 2259–2273. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75474-3](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75474-3)
- Duffield, T. (2000). Subclinical Ketosis in Lactating Dairy Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16(2), 231–253. [http://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30103-1](http://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30103-1)
- Duffield, T. F., Lissemore, K. D., McBride, B. W., & Leslie, K. E. (2009). Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of Dairy Science*, 92(2), 571–580. <http://doi.org/10.3168/jds.2008-1507>
- Eastridge, M. L., Bucholtz, H. F., Slater, a L., & Hall, C. S. (1998). Nutrient requirements for dairy cattle of the National Research Council versus some commonly used ration software. *Journal of Dairy Science*, 81(11), 3049–3062. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75870-9](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75870-9)
- Ebashi, S. (1985). Ca 2+ in biological systems. *National Institute for Physiological Sciences, Myodao'i, Okazaki 444 (Japan)*, 444, 978–981.
- El-Samad, H., Goff, J. P., & Khammash, M. (2002). Calcium Homeostasis and Parturient Hypocalcemia: An Integral Feedback Perspective. *Journal of Theoretical Biology*, 214(1), 17–29. <http://doi.org/10.1006/jtbi.2001.2422>

- Erb, H. N., Smith, R. D., Oltenacu, P. a, Guard, C. L., Hillman, R. B., Powers, P. a, ... White, M. E. (1985). Path model of reproductive disorders and performance, milk fever, mastitis, milk yield, and culling in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 68(12), 3337–3349. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)81244-3](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)81244-3)
- Goff, J. P. (1999). Treatment of calcium, phosphorus, and magnesium balance disorders. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 15(3), 619–39, viii. [http://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30167-5](http://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30167-5)
- Goff, J. P. (2008). The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *The Veterinary Journal*, 176(1), 50–57. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.020>
- Goff, J. P. (2014). Calcium and magnesium disorders. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 30(2), 359–81, vi. <http://doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.04.003>
- Goff, J. P., & Horst, R. L. (1993). Oral administration of calcium salts for treatment of hypocalcemia in cattle. *Journal of Dairy Science*, 76(1), 101–108. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77328-2](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77328-2)
- Goff, J. P., & Horst, R. L. (1994). Calcium salts for treating hypocalcemia: carrier effects, acid-base balance, and oral versus rectal administration. *Journal of Dairy Science*, 77(5), 1451–6. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77083-1](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77083-1)
- Goff, J. P., & Horst, R. L. (1997). Physiological Changes at Parturition and Their Relationship to Metabolic Disorders. *Journal of Dairy Science*, 80(7), 1260–1268. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76055-7](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76055-7)
- Goff, J. P., Horst, R. L., Beitz, D. C., & Littledike, E. T. (1988). Use of 24-F-1,25-dihydroxyvitamin D3 to prevent parturient paresis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 71(5), 1211–9. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79676-9](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79676-9)
- Goff, J. P., Horst, R. L., Jardon, P. W., Borelli, C., & Wedam, J. (1996). Field Trials of an Oral Calcium Propionate Paste as an Aid to Prevent Milk Fever in Periparturient Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 79(10), 378–383. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76375-0](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76375-0)
- Goff, J. P., Horst, R. L., Mueller, F. J., Miller, J. K., Kiess, G. a, & Dowlen, H. H. (1991).

- Addition of chloride to a prepartal diet high in cations increases 1,25-dihydroxyvitamin D response to hypocalcemia preventing milk fever. *Journal of Dairy Science*, 74(11), 3863–3871. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78579-2](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78579-2)
- Goff, J. P., Littledike, E. T., & Horst, R. L. (1986). Effect of synthetic bovine parathyroid hormone in dairy cows: prevention of hypocalcemic parturient paresis. *Journal of Dairy Science*, 69(9), 2278–2289. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80666-X](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(86)80666-X)
- Goff, J. P., Reinhardt, T. A., & Horst, R. L. (1989). Recurring hypocalcemia of bovine parturient paresis is associated with failure to produce 1,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology*, 125(1), 49–53. <http://doi.org/10.1210/endo-125-1-49>
- Goff, J. P., Reinhardt, T. a, & Horst, R. L. (1995). Milk fever and dietary cation-anion balance effects on concentration of vitamin D receptor in tissue of periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 78(11), 2388–2394. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76867-9](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76867-9)
- Green, H. B., Horst, R. L., Beitz, D. C., & Littledike, E. T. (1981). Vitamin D metabolites in plasma of cows fed a prepartum low-calcium diet for prevention of parturient hypocalcemia. *Journal of Dairy Science*, 64(2), 217–226. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(81\)82557-X](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(81)82557-X)
- Gregghi, G. F., Netto, A. S., Silva, S. da L. e, & Marcus Antonio Zanetti. (2014). Anionic mineral supplement to cows in the peripartum : blood , urine parameters and incidence of diseases of importance in dairy cattle. *Pesquisa Veterinária Brasileira*.
- Grummer, R. R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow Impact of Changes in Organic Nutrient Metabolism Feeding the Transition Dairy Cowl. *Journal of Animal Science*, 73, 2820–2833.
- Hanai, H., Brennan, D. P., Cheng, L., Goldman, M. E., Chorev, M., Levine, M. A., ... Liang, C. T. (1990). Downregulation of parathyroid hormone receptors in renal membranes from aged rats. *The American Journal of Physiology*, 259(OCTOBER), F444–F450.
- Hendy, G. N., & Canaff, L. (2015). Calcium-sensing receptor, pro-inflammatory cytokines and calcium homeostasis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. <http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.11.006>
- Heuer, C., Schukken, Y. H., & Dobbelaar, P. (1999). Postpartum body condition score and

- results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 82(2), 295–304. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75236-7](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75236-7)
- Hibbs, J. W. (1950). Milk fever (parturient paresis) in dairy cows: a review. *Ohio Agricultural Experiment Station, Wooster*, (31), 758–789. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(50\)91966-7](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(50)91966-7)
- Hoorn, E. J., & Zietse, R. (2013). Disorders of calcium and magnesium balance: a physiology-based approach. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, 28(8), 1195–206. <http://doi.org/10.1007/s00467-012-2350-2>
- Horst, R. L., Goff, J. P., & Reinhardt, T. A. (1990). Advancing Age Results in Reduction of Intestinal and Bone 1,25-Dihydroxyvitamin D Receptor. *Endocrinology*, 126(2), 1053–1057. Retrieved from <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/endo-126-2-1053>
- Horst, R. L., Goff, J. P., & Reinhardt, T. A. (1994). Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. *Journal of Dairy Science*, 77(7), 1936–51. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77140-X](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77140-X)
- Horst, R. L., Goff, J. P., Reinhardt, T. A., & Buxton, D. R. (1997). Strategies for Preventing Milk Fever in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 80(7), 1269–1280. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76056-9](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76056-9)
- 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(3), 1240–8. <http://doi.org/10.3168/jds.2011-4586>
- Kamgarpour, R., Daniel, R. C. W., Fenwick, D. C., Mcguigan, K., & Murphy, G. (1999). Post partum Subclinical Hypocalcaemia and Effects on Ovarian Function and Uterine Involution in a Dairy Herd. *The Veterinary Journal*, 59–67.
- Kichura, T. S., Horst, R. L., Beitz, D. C., & Littledike, E. T. (1982). Relationships between prepartal dietary calcium and phosphorus, vitamin D metabolism, and parturient paresis in dairy cows. *The Journal of Nutrition*, 112(3), 480–487.
- 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(7), 2588–

2595. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72335-9](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72335-9)

- Koch, G. M. da S. (2013, December 8). Incidência e consequências da hipocalcemia subclínica no pós-parto de vacas leiteiras. Universidade de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária. Retrieved from <http://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/6248>
- 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(2), 669–684. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72130-0](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72130-0)
- Liesegang, A., Eicher, R., Sassi, M. L., Risteli, J., Kraenzlin, M., Riond, J. L., & Wanner, M. (2000). Biochemical markers of bone formation and resorption around parturition and during lactation in dairy cows with high and low standard milk yields. *Journal of Dairy Science*, 83(8), 1773–81. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75048-X](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75048-X)
- Liesegang, A., Sassi, M. L., Risteli, J., Eicher, R., Wanner, M., & Riond, J. L. (1998). Comparison of bone resorption markers during hypocalcemia in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 81(10), 2614–22. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75819-9](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75819-9)
- Liesegang, A., Singer, K., & Boos, A. (2008). Vitamin D receptor amounts across different segments of the gastrointestinal tract in Brown Swiss and Holstein Frisian cows of different age. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92(3), 316–23. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00782.x>
- Littledike, E. T., & Horst, R. L. (1982). Vitamin D₃ Toxicity in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 65(5), 749–759. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82263-7](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82263-7)
- Martens, H., & Rayssiguier, Y. (1980). Magnesium metabolism and hypomagnesaemia. In Y. Ruckebusch & P. Thivend (Eds.), *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants* (pp. 447–466). Dordrecht: Springer Netherlands. <http://doi.org/10.1007/978-94-011-8067-2>
- Mayer, G. P., Ramberg, C. F., Kronfeld, D. S., Buckle, R. M., Sherwood, L. M., Aurbach, G. D., & Potts, J. T. (1969). Plasma parathyroid hormone concentration in hypocalcemic parturient cows. *American Journal of Veterinary Research*, 30(9), 1587–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5817010>
- Mcart, J. A. A., & Oetzel, G. R. (2015). A stochastic estimate of the economic impact of oral calcium supplementation in postparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98(10),

7408–7418. <http://doi.org/10.3168/jds.2015-9479>

- Melendez, P., Donovan, G. A., Risco, C. A., & Goff, J. P. (2004). Plasma mineral and energy metabolite concentrations in dairy cows fed an anionic prepartum diet that did or did not have retained fetal membranes after parturition. *American Journal of Veterinary Research*, 65(8), 1071–1076. <http://doi.org/10.2460/ajvr.2004.65.1071>
- Mendelez, P. (2008). Nutritional management of the transition period to optimize fertility in dairy cattle. *Veterinary Practitioner*, 9, 83–88.
- Mulligan, F. J., Rice, D., & Doherty, M. L. (2006). Production diseases of the transition cow: Milk fever and subclinical hypocalcaemia. *Irish Veterinary Journal*, 59(12), 697–703. Retrieved from <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ic&volume=8&issue=31&article=007&type=pdf>
- Oetzel, G. R. (2011). Non-infectious diseases: milk fever. In F. JW & M. PL (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2nd ed., Vol. 2, pp. 239–245). San Diego: Elsevier Ltd. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Oetzel, G. R. (2012). An update on hypocalcemia on dairy farms. *Proceedings of the Four-State Dairy Nutrition and Management Conference*, 80–85. Retrieved from [http://livestocktrail.illinois.edu/uploads/dairynet/papers/Update Hypocalcemia Oetzel.pdf](http://livestocktrail.illinois.edu/uploads/dairynet/papers/UpdateHypocalcemiaOetzel.pdf)
- Oetzel, G. R. (2013). Oral calcium supplementation in peripartum dairy cows. <http://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.03.006>
- Oetzel, G. R., & Barmore, J. A. (1993). Intake of a Concentrate Mixture Containing Various Anionic Salts Fed to Pregnant , Nonlactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 76(6), 1617–1623. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77495-0](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77495-0)
- Østergaard, S., & Larsen, T. (1999). Short Communication : Associations Between Blood Calcium Status at Calving and Milk Yield in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 83(11), 2438–2440. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75134-4](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75134-4)
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., & Hincliff, K. W. (2000). *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats* (9th ed.). Elsevier Ltd. Retrieved from <https://books.google.com/books?hl=pt-PT&lr=&id=JP7TBQAAQBAJ&pgis=1>

- Reinhardt, T. A., Lippolis, J. D., McCluskey, B. J., Goff, J. P., & Horst, R. L. (2011). Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 188(1), 122–4. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.025>
- Risco, C. A., Reynolds, J. P., & Hird, D. (1984). Uterine prolapse and hypocalcemia in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185(12), 1517–9. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/med/6511623>
- Rosol, T. J., & Capen, C. C. (1997). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. <http://doi.org/10.1016/B978-012396305-5/50024-5>
- Rosol, T. J., Chew, D. J., Nagode, L. a., & Capen, C. C. (1995). Pathophysiology of calcium metabolism. *Veterinary Clinical Pathology*, 24(2), 49–63. <http://doi.org/10.1111/j.1939-165X.1995.tb00937.x>
- Rouse, D., & Suki, W. N. (1990). Renal control of extracellular calcium. *Kidney International*, 38, 700–708. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2232507>
- Rude, R. K. (1998). Magnesium deficiency: a cause of heterogenous disease in humans. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(4), 749–758. <http://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.4.749>
- Sampson, J. D., Spain, J. N., Jones, C., & Carstensen, L. (2009). Effects of Calcium Chloride and Calcium Sulfate in an Oral Bolus Given as a Supplement to Postpartum Dairy Cows. *Veterinary Therapeutics*, 10(3), 131–139. Retrieved from https://s3.amazonaws.com/assets.prod.vetlearn.com/mmah/7d/797eed736f4b15a24551664356223e/fileVTX_10_03_131.pdf
- Sargeant, J. M., Leslie, K. E., Shirley, J. E., Pulkrabek, B. J., & Lim, G. H. (2001). Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for identifying intramammary infection in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 84(9), 2018–24. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74645-0](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74645-0)
- Sato, R., Onda, K., Kato, H., Ochiai, H., Kawai, K., Iriki, T., ... Wada, Y. (2013). An evaluation of the effect of age and the peri-parturient period on bone metabolism in dairy cows as measured by serum bone-specific alkaline phosphatase activity and urinary deoxypyridinoline concentration. *Veterinary Journal*, 197(2), 358–362.

<http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.01.013>

- Sciorsci, R. L., Dell'Aquila, M. E., & Minoia, P. (2001). Effects of naloxone on calcium turnover in cows affected by milk fever. *Journal of Dairy Science*, 84(7), 1627–31. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74597-3](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74597-3)
- 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(November 2015), 281–285. [http://doi.org/10.1016/S1090-0233\(03\)00114-X](http://doi.org/10.1016/S1090-0233(03)00114-X)
- Sheldon, I. M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G., Schuberth, H. H.-J., & Veterinaria, M. (2009). Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle. *Biology of Reproduction*, 1032(April), 1025–1032. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077370>
- Sheldon, I. M., & Whiteford, L. C. (2005). Association between clinical hypocalcaemia and postpartum endometritis. *The Veterinary Record*, 4–7. <http://doi.org/10.1136/vr.157.7.202>
- Shohl, T., & Sato, A. (1922). Acid-base Metabolism I. Determination of Base Balance. *J Biol Chem*, (58), 235. Retrieved from www.jbc.org/content/58/1/235.full.pdf
- Teti, A., & Zallone, A. (2009). Do osteocytes contribute to bone mineral homeostasis? Osteocytic osteolysis revisited. *Bone*, 44(1), 11–16. <http://doi.org/10.1016/j.bone.2008.09.017>
- Thilsing-Hansen, T., Jørgensen, R. J., & Østergaard, S. (2002). Milk fever control principles: a review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43(1), 1–19. <http://doi.org/10.1186/1751-0147-43-1>
- Tveit, B., Svendsen, M., & Hove, K. (1991). Heritability of hypocalcemia at first parturition in Norwegian cattle: genetic correlations with yield and weight. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3561–3567. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78548-2](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78548-2)
- van Mosel, M., & Corlett, S. C. (1990). Assessment of bone turnover in the dry period of dairy cows by measurement of plasma bone GLA protein, total plasma alkaline phosphatase activity and urinary hydroxyproline. *Experimental Physiology*, 75(6), 827–37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2271160>

- Yamagishi, N., Dohmae, H., Shirato, A., Sato, J., Sato, R., & Naito, Y. (2000). Effects of oral administration of “rumen-bypass” vitamin D3 on vitamin D and calcium metabolism in periparturient cows. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 62, 403–408. <http://doi.org/10.1292/jvms.62.403>
- Yamagishi, N., Takehana, K., Kim, D., Miura, M., Hirata, T., Devkota, B., ... Furuhashi, K. (2009). Fluorometric method for measuring plasma tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b and its application in cattle. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 71(12), 1637–1642. <http://doi.org/10.1292/jvms.001637>

Anexos

Anexo I – Bovikalc

BOVIKALC

Alimento Mineral para Ruminantes

Composição Qualitativa:

Cloreto de cálcio 58 %

Sulfato de cálcio 23 %

Ricinoleato de glicerilpolietilenoglicol (E484) 6 %

Goma xantana (E415) < 1 %

Constituintes analíticos:

Cinza bruta 67 %

Humidade 30 %

Gordura bruta 3 %

Cálcio 22 %

Fósforo 0 %

Sódio 0 %

Magnésio 0 %

Forma Farmacêutica:

Bolo oral.

Código ATCVet:

Não se aplica

Espécie animal alvo:

Bovinos.

Indicações:

BOVIKALC é um complemento de cálcio para vacas, indicado em situações de maiores necessidades deste mineral. BOVIKALC está especialmente indicado depois do parto, quando as necessidades de cálcio são mais elevadas como consequência do início da lactação. BOVIKALC apresenta-se na forma de bolo coberto de glicerina, para facilitar a sua administração por via oral. A sua cobertura especial protege a garganta e o esófago de possíveis irritações que podiam ser causadas pelo cloreto de cálcio. Uma vez no rumen, a cobertura dissolve-se em 15-30 minutos e o cloreto de cálcio é instantaneamente libertado e assimilado, enquanto que o sulfato de cálcio proporciona uma fonte de cálcio adicional retardada.

Modo de emprego:

Administrar por via oral com a ajuda do aplicador, 4 bolos por vaca: Primeiro bolo aos primeiros sinais de parto Segundo bolo imediatamente após o parto Terceiro bolo 10-14 horas depois do parto Quarto bolo 24 horas após o parto

Condições de conservação:

Conservar a temperatura inferior a 30°C, em lugar seco e ao abrigo da luz.

Apresentações:

Embalagens de 4 Bolos de 190 g

Anexo II – Apreciação da CEBEA-ULHT



Anexo 4 - Apreciação da CEBEA-ULHT

Lisboa, 5 de Julho de 2016

Exmo Aluno Vasco Rodrigues Vara Franco,

A Comissão de Ética e Bem Estar Animal da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, vem por este meio informar, que o projecto intitulado “Efeito da suplementação oral de cálcio pós-parto na prevenção de hipocalcemia” com o processo nº 74-2016, foi considerado aprovado.

Esta aprovação é válida por um ano e pode ser usada para efeitos de publicação. Caso o projecto tenha uma duração superior a um ano, deverá ser requisitada renovação à CEBEA-ULHT.

Ana Margarida Oliveira

Coordenador CEBEA-ULHT

Manuel Pequito

Secretário CEBEA-ULHT

Anexo III – Material e métodos

ABX Pentra Calcium AS CP

■ ABX Pentra 400

2015/02/20
A93A01290CPT

REF A11A01954

REAGENT 90 mL



IVD CE

HORIBA ABX SAS
Parc Euromédecine - Rue du Caducée
B.P. 7290
34184 MONTPELLIER Cedex 4
FRANCE

Reagente de diagnóstico para a determinação quantitativa *in-vitro* de cálcio em soro, plasma e urina por colorimetria.

Instruções do teste

Soro, plasma: CaAS^a

3.xx

Urina: CaU_AS^a

3.xx

Utilização^b

O **ABX Pentra Calcium AS CP**, com calibrador e controlos associados, é um reagente de diagnóstico para a determinação quantitativa *in vitro* de cálcio em soro, plasma e urina humanos, com base num método colorimétrico, utilizando o analisador de química clínica ABX Pentra 400. A medição de cálcio é utilizada no diagnóstico e tratamento da doença da paratiroide, uma série de doenças ósseas, doença renal crónica e tétano (contrações ou espasmos musculares intermitentes).

Interesse clínico (1, 2, 3)

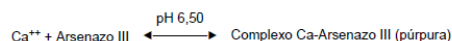
O cálcio desempenha um papel essencial em muitas funções celulares: de forma intracelular na contracção dos músculos e no metabolismo do glicogénio, de forma extracelular na mineralização dos ossos, na coagulação do sangue e na transmissão dos impulsos nervosos. O cálcio está presente no plasma em três formas: livre, ligado às proteínas ou em complexos com aniões como o fosfato, citrato e bicarbonato. Em condições fisiológicas, o equilíbrio de cálcio é determinado pela relação entre a ingestão de cálcio e a sua absorção e excreção. A excreção urinária é um importante indicador da retenção

de cálcio no corpo. Os níveis reduzidos de cálcio total podem estar associados a doenças do sistema ósseo (especialmente a osteoporose), doenças dos rins (em especial sob diálise), absorção intestinal deficiente e hipoparatiroidismo. O cálcio total aumentado pode ser medido no hiperparatiroidismo, doenças malignas com metástases e sarcoidose. As medições de cálcio também ajudam a monitorizar a suplementação de cálcio, principalmente na prevenção da osteoporose.

Método (4, 5, 6, 7)

Vários métodos colorimétricos para a determinação do cálcio já foram utilizados no passado. Connerty e Briggs descreveram métodos que usavam alizarina 3-sulfonato (4) e cresolftaleína complexona (5) enquanto Gindler e King descreveram um método que usava azul de timol (6). Já foram feitas várias modificações posteriores a estes métodos. O método utilizado aqui baseia-se no metalocromogénio Arsenazo III. Os íons de cálcio (Ca²⁺) reagem com o Arsenazo III (2,2'-[1,8-Diidroxi-3,6-disulfonafileno-2,7-bisazo]-ácido bisbenzoarsónico) 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 reacção é directamente proporcional à concentração de cálcio presente na amostra. O Arsenazo III possui alta afinidade ($K^o = 1 \times 10^{-7}$) com os íons de cálcio (7) e não apresenta interferência de outros cátions normalmente presentes no soro, plasma ou urina.



^aModificação: modificação das instruções do teste.

^bModificação: modificação do volume do reagente.

ABX Pentra Calcium AS CP

Reagentes

ABX Pentra Calcium AS CP está pronto a utilizar.

Reagente:

MES pH6,50	100 mmol/L
Arsenazo III	200 µmol/L

ABX Pentra Calcium AS CP deve ser utilizado de acordo com a nota informativa deste reagente. O fabricante não se responsabiliza pelo seu desempenho caso seja utilizado de outro modo.

Preparação

1. Retire a tampa da cassete.
2. Em caso de formação de espuma, retire-a com uma pipeta de plástico.
3. Posicione a tampa de protecção ref. GBM0969 na cassete.
4. Coloque a cassete no compartimento de refrigeração de reagentes do ABX Pentra 400.

Calibrador

Para calibrar, utilize:

ABX Pentra Multical, Ref. A11A01652 (não incluído)
10 x 3 mL (liofilizado)

Controlo

Para controlo de qualidade interno, utilize:

ABX Pentra N Control, Ref. A11A01653 (não incluído)
10 x 5 mL (liofilizado)

ABX Pentra P Control, Ref. A11A01654 (não incluído)
10 x 5 mL (liofilizado)

ABX Pentra Urine Control L/H, Ref. A11A01674 (não incluído)

1 x 10 mL + 1 x 10 mL

Cada controlo deve ser analisado diariamente e/ou após a calibração.

A frequência dos controlos e os intervalos de confiança devem estar de acordo com as normas laboratoriais e com as diretivas específicas de cada país. Deve cumprir as diretrizes federais, estaduais e locais relativamente ao teste de controlo de qualidade dos materiais. Os resultados devem ficar dentro do intervalo dos limites de confiança definidos. Cada laboratório deve estabelecer o procedimento a seguir se os resultados excederem esses limites de confiança.

Materiais necessários mas não fornecidos

- Analisador automático de química clínica: ABX Pentra 400
- Calibrador: **ABX Pentra Multical**, Ref. A11A01652
- Controlos:
 - ABX Pentra N Control**, Ref. A11A01653, e
 - ABX Pentra P Control**, Ref. A11A01654
 - ABX Pentra Urine Control L/H**, Ref. A11A01674
- Equipamento standard de laboratório.

Amostra (8)

- Soro.
- Plasma em heparina de lítio.
- Urina.

Não utilizar plasma em EDTA: O anticoagulante EDTA não é adequado para análises, uma vez que este composto realiza quelação com o cálcio, tornando o indisponível para reacção com o reagente.

Os anticoagulantes que não estão presentes na lista não foram testados pela HORIBA Medical e, portanto, não são recomendados para utilização com este ensaio.

Devem ser recolhidas amostras de urina em 24 horas, com HCl 6N (9). As urinas não acidificadas que foram refrigeradas devem ser acidificadas e/ou aquecidas a 56°C por 15 minutos para redissolver os precipitados.

Estabilidade da amostra (8):

Soro/plasma:

por até 7 dias a 20-25°C.

por até 3 semanas a 4-8°C.

por até 8 meses a -20°C.

Urina:

por até 2 dias a 20-25°C.

por até 4 dias a 4-8°C.

por até 3 semanas a -20°C.

Intervalo de referência (2)

Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios intervalos de referência. Os valores aqui fornecidos são utilizados apenas como linhas de orientação.

Soro/Plasma:

2,15 - 2,57 mmol/L (8,6 - 10,3 mg/dL)

ABX Pentra Calcium AS CP

Urina:

Mulheres: < 6,24 mmol/24h (< 250 mg/24h)

Homens: < 7,49 mmol/24h (< 300 mg/24h)

Armazenamento e Estabilidade

Os reagentes, nas cassetes por abrir, mantêm-se estáveis até à data de validade indicada no rótulo se forem armazenados entre 2-8°C, ao abrigo da luz. Estabilidade após a abertura: consulte o parágrafo "Desempenho do ABX Pentra 400".

Gestão de resíduos

É favor consultar os requisitos da legislação local.

Precauções gerais ^c

- Este reagente destina-se apenas a diagnóstico *in vitro* profissional.
- Sujeito a prescrição.
- Este reagente é classificado como não perigoso de acordo com a regulamentação (EC) N.º.1272/2008.
- Uma vez que o cálcio é um ião ubíquo, devem ser tomadas precauções de modo a evitar contaminação accidental. Utilizar apenas materiais descartáveis.
- Cumpra as normas preventivas de laboratório relativas à utilização.
- As cassetes de reagente são descartáveis e devem ser eliminadas de acordo com os requisitos da legislação local.
- Consulte a MSDS (folha de dados de segurança do material) relacionada com o reagente.
- Não utilizar o produto se houver evidência visível de deterioração biológica, química ou física.
- É da responsabilidade do utilizador verificar se este documento se aplica ao reagente utilizado.

Desempenho do ABX Pentra 400

Os dados de desempenho enunciados em seguida foram obtidos a partir do analisador ABX Pentra 400.

Soro, plasma

Número de testes: 285 testes ^d

^cModificação: modificação das precauções gerais.

^dModificação: novo número de testes.

^eModificação: modificação da estabilidade dos reagentes no equipamento.

Estabilidade dos reagentes no sistema ^e:

Depois de aberta, a cassette de reagente colocada no compartimento de refrigeração ABX Pentra 400 mantém-se estável durante 70 dias.

Volume da amostra: 5 µL/teste

Limite de quantitação:

O limite de quantitação é determinado de acordo com o protocolo CLSI (NCCLS), EP17-A (10) e equivale a 0,37 mmol/L (1,54 mg/dL).

Limite de deteção:

O limite de deteção é determinado de acordo com o protocolo CLSI (NCCLS), EP17-A (10) e equivale a 0,07 mmol/L (0,28 mg/dL).

Exatidão e Precisão:

- Repetibilidade (precisão no mesmo ciclo)

3 amostras de concentrações baixa, média e alta e 2 controlos são testados 20 vezes de acordo com as recomendações especificadas no protocolo Valtec (11).

	Valor médio		CV %
	mmol/L	mg/dL	
Amostra de controlo 1	2,09	8,39	0,49
Amostra de controlo 2	3,12	12,53	0,37
Amostra 1	1,72	6,91	0,71
Amostra 2	2,29	9,18	0,40
Amostra 3	3,28	13,15	0,43

- Reprodutibilidade (precisão total)

3 amostras de nível baixo, médio e elevado e 2 controlos são testados em duplicado durante 20 dias (2 séries por dia) de acordo com as recomendações incluídas no protocolo CLSI (NCCLS), EP5-A2 (12).

	Valor médio		CV %
	mmol/L	mg/dL	
Amostra de controlo 1	2,17	8,72	1,44

ABX Pentra Calcium AS CP

	Valor médio		CV %
	mmol/L	mg/dL	
Amostra de controlo 2	3,25	13,02	1,49
Amostra 1	1,75	7,03	1,56
Amostra 2	2,36	9,47	1,54
Amostra 3	3,23	12,93	1,54

Intervalo de medição:

O ensaio confirmou uma gama de medição de 1 a 4,50 mmol/L (4,0 a 18,05 mg/dL), com pós-diluição automática de até 13,50 mmol/L (54,15 mg/dL).

A linearidade do reagente foi avaliada para até 4,50 mmol/L (18,05 mg/dL), de acordo com as recomendações incluídas no protocolo CLSI (NCCLS), EP6-A (13).

Correlação:

145 amostras de pacientes (soro e plasma) estão correlacionadas com um reagente já comercializado tomado como referência de acordo com as recomendações incluídas no protocolo CLSI (NCCLS), EP9-A2 (14). Valores no intervalo de 1,04 a 3,93 mmol/L (4,17 a 15,76 mg/dL).

A equação da linha alométrica obtida por meio do procedimento de regressão Passing-Bablok (15) é:

$$Y = 1,00 X + 0,01 \text{ (mmol/L)}$$

$$Y = 1,00 X + 0,04 \text{ (mg/dL)}$$

com um coeficiente de correlação $r^2 = 0,9903$.

Estudo de comparação da matriz:

Um estudo de comparação de matriz entre amostras de soro e plasma de lítio foi realizado utilizando 32 amostras pareadas de soro e plasma de lítio, com concentração de cálcio entre 1,0 e 4,36 mmol/L (4,0 e 17,5 mg/dL) (3 amostras foram alteradas).

Cada amostra foi testada em separado, utilizando o reagente de ensaio ABX Pentra Calcium AS CP. Uma análise de regressão linear representando as amostras de soro (eixo x) e plasma de lítio (eixo y) indicou as seguintes relações entre os tipos de matrizes: $Y = 1,006 X - 0,0022$, $r^2 = 0,996$.

Interferências:

Hemoglobina:	Não se observa influência significativa até 290 $\mu\text{mol/L}$ (500 mg/dL).
Lipémia:	Não se observa influência significativa até uma concentração de Intralipid® (representativa de lipémia) de 500 mg/dL.
Bilirrubina total:	Não se observa influência significativa até 788 $\mu\text{mol/L}$ (46,1 mg/dL).
Bilirrubina directa:	Não se observa influência significativa até 445 $\mu\text{mol/L}$ (26,0 mg/dL).
Ácido ascórbico:	Não se observa influência significativa até 3,40 mmol/L (60 mg/dL).
Magnésio:	Não se observa influência significativa até 4,42 mmol/L (10,7 mg/dL).
Acetaminofeno:	Não se observa influência significativa até 1324 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/dL).
Ibuprofeno:	Não se observa influência significativa até 2,42 mmol/L (50,1 mg/dL).
Ácido acetilsalicílico:	Não se observa influência significativa até 3,62 mmol/L (65,2 mg/dL).

Outros limites são fornecidos por Young através de uma lista de medicamentos e variáveis pré-analíticas conhecidas que afectam esta metodologia (16, 17).

Estabilidade de calibração:

O reagente é calibrado no Dia 0. A estabilidade de calibração é verificada testando 2 amostras de controlo. A estabilidade da calibração é de 10 dias.

Nota: Recomenda-se uma recalibração quando os lotes de reagente mudam e quando os resultados do controlo de qualidade ficam fora do intervalo de valores estabelecido.

Instruções do teste^a:

3.xx

Urina

Número de testes: 285 testes^d

^aModificação: modificação das instruções do teste.

^dModificação: novo número de testes.

ABX Pentra Calcium AS CP

Estabilidade dos reagentes no sistema^a:

Depois de aberta, a cassete de reagente colocada no compartimento de refrigeração ABX Pentra 400 mantém-se estável durante 70 dias.

Volume da amostra: 5 µL/teste

Limite de quantitação:

O limite de quantitação é determinado de acordo com o protocolo CLSI (NCCLS), EP17-A (10) e equivale a 0,16 mmol/L (0,64 mg/dL).

Limite de detecção:

O limite de detecção é determinado de acordo com o protocolo CLSI (NCCLS), EP17-A (10) e equivale a 0,07 mmol/L (0,23 mg/dL).

Exatidão e Precisão:

■ Repetibilidade (precisão no mesmo ciclo)

3 amostras de concentrações baixa, média e elevada e 2 controlos são testados 20 vezes de acordo com as recomendações especificadas no protocolo Valtec (11).

	Valor médio		CV %
	mmol/L	mg/dL	
Amostra de controlo 1	1,81	7,27	0,62
Amostra de controlo 2	2,71	10,86	0,76
Amostra 1	1,93	7,73	0,46
Amostra 2	2,62	10,50	0,56
Amostra 3	3,62	14,50	0,37

■ Reprodutibilidade (precisão total)

3 amostras de nível baixo, médio e elevado e 2 controlos são testados em duplicado durante 20 dias (2 séries por dia) de acordo com as recomendações incluídas no protocolo CLSI (NCCLS), EP5-A2 (12).

	Valor médio		CV %
	mmol/L	mg/dL	
Amostra de controlo 1	1,82	7,28	1,45
Amostra de controlo 2	2,67	10,71	1,50
Amostra 1	1,92	7,70	1,57

	Valor médio		CV %
	mmol/L	mg/dL	
Amostra 2	2,56	10,27	1,57
Amostra 3	3,54	14,21	1,56

Intervalo de medição:

O ensaio confirmou uma gama de medição de 0,16 a 4,50 mmol/L (0,64 a 18,05 mg/dL), com pós-diluição automática de até 13,50 mmol/L (54,15 mg/dL).

A linearidade do reagente foi avaliada para até 4,50 mmol/L (18,05 mg/dL), de acordo com as recomendações incluídas no protocolo CLSI (NCCLS), EP6-A (13).

Correlação:

143 amostras de pacientes (urina) estão correlacionadas com um reagente já comercializado tomado como referência de acordo com as recomendações incluídas no protocolo CLSI (NCCLS), EP9-A2 (14). Valores no intervalo de 0,16 a 4,44 mmol/L (0,64 a 17,80 mg/dL).

A equação da linha alométrica obtida por meio do procedimento de regressão Passing-Bablok (15) é:

$$Y = 0,98 X - 0,01 \text{ (mmol/L)}$$

$$Y = 0,98 X - 0,03 \text{ (mg/dL)}$$

com um coeficiente de correlação $r^2 = 0,993$.

Interferências:

Hemoglobina: Não se observa influência significativa até 290 µmol/L (500 mg/dL).

Lipémia: Não se observa influência significativa até uma concentração de Intralipid® (representativa de lipémia) de 200 mg/dL.

Bilirrubina directa: Não se observa influência significativa até 432 µmol/L (25,3 mg/dL).

Ácido ascórbico: Não se observa influência significativa até 3,40 mmol/L (60 mg/dL).

Magnésio: Não se observa influência significativa até 5,34 mmol/L (13,0 mg/dL).

pH: A urina não deve ser alcalinizada.

Outros limites são fornecidos por Young através de uma lista de medicamentos e variáveis pré-analíticas conhecidas que afectam esta metodologia (16, 17).

Estabilidade de calibração:

O reagente é calibrado no Dia 0. A estabilidade de calibração é verificada testando 2 amostras de controlo.

^aModificação: modificação da estabilidade dos reagentes no equipamento.

ABX Pentra Calcium AS CP

A estabilidade da calibração é de 10 dias.

Nota: Recomenda-se uma recalibração quando os lotes de reagente mudam e quando os resultados do controlo de qualidade ficam fora do intervalo de valores estabelecido.

Instruções do teste^a:

3.xx

Fator de conversão:

mmol/L x 4,01 = mg/dL

Bibliografia

1. Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft (1998): 192-202.
2. Endres DB, Rude RK. Mineral and bone metabolism. In: Burtis C.A., Ashwood E.R., editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: WB. Saunders Company (1999): 1395-1457.
3. Matkovic V, Llich JZ, Andon MB, Hsieh LC, Tzagournis MA, Lagger BJ, Goel PK, Am. J. Clin. Nutr. (1995) **62** (2): 417-25.
4. Connerty HV, Briggs AR. Clin. Chem. (1965) **11**: 716-28.
5. Connerty HV, Briggs AR. Am. J. Clin. Path. (1966) **45**: 290-6.
6. Gindler EM, Kin JD, Am. J. Clin. Path. (1972) **58**: 376-82.
7. Bauer PJ. Anal. Biochem. (1981) **110**: 61-72.
8. Ehret W, Heil W, Schmitt Y, Töpfer G, Wisser H, Zawta B et al. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and serum samples. WHO publication WHO/DIL/LAB/99.1 Rev.2: 25 (2002).
9. NCCLS. Urinalysis and collection, transportation and preservation of urine specimen; Approved guideline - 2nd Edition, NCCLS document GP16-A2, **21** (19).
10. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation. Approved Guideline, CLSI (NCCLS) document EP17-A (2004) **24** (34).
11. Vassault A, Grafmeyer D, Naudin C et al. Protocole de validation de techniques (document B). Ann. Biol. Clin. (1986) **44**: 686-745.
12. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Method. Approved Guideline, CLSI (NCCLS) document EP5-A2 (2004) **24** (25).
13. Evaluation of the Linearity of Quantitative Analytical Methods. Approved Guideline, CLSI (NCCLS) document EP6-A (2003) **23** (16).
14. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples. Approved Guideline, 2nd ed., CLSI (NCCLS) document EP9-A2 (2002) **22** (19).
15. Passing H, Bablock W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1983) **21**: 709-20.
16. Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. 4th Edition, Washington, DC, AACC Press (1997) **3**: 143-163.
17. Young DS. Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests. 2nd Edition, Washington, DC, AACC Press (1997) **3**: 120-132.

^aModificação: modificação das instruções do teste.