

Tomás Pais Grilo

**QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE CÁLCIO E FÓSFORO NO PÓS-PARTO E
A SUA RELAÇÃO COM PATOLOGIAS DO PUERPÉRIO EM BOVINOS
LEITEIROS**

ORIENTADOR: Professora Doutora Sofia V. Harten

UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIAS

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2020

Tomás Pais Grilo

**QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE CÁLCIO E FÓSFORO NO PÓS-PARTO E
A SUA RELAÇÃO COM PATOLOGIAS DO PUERPÉRIO EM BOVINOS
LEITEIROS**

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona de Humanidades e tecnologias, Lisboa no dia 19 de Março de 2020, para a obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Despacho reitoral N°88/2020, de 3 de Março.

Júri com a seguinte composição:

- **Presidente:** Prof. Doutora Laurentina Pedroso;
- **Arguente:** Prof. Doutora Ângela Dâmaso;
- **Orientadora:** Prof. Doutora Sofia Van Harten.

UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIAS

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2020

Agradecimentos

Queria agradecer ao pessoal da Pecbom, Lda pela possibilidade de realizar o meu estudo nas suas instalações.

Aos meus familiares, queria agradecer por me terem apoiado incondicionalmente ao longo de todo o percurso.

À minha namorada, o meu obrigado só por me aturares.

Aos meus amigos, o meu obrigado porque a faculdade não se faz sozinha. Vocês são os maiores.

Ao Dr. Gonçalo Ortega, o meu muito obrigado pela ajuda que me deu e toda a paciência que têm para comigo.

À Dra. Sofia o meu obrigado por me ter aceite orientar a minha tese.

À Dra. Carla Noronha o meu muito obrigado pela ajuda que me deu. Você foi 5 estrelas.

Resumo

A hipocalcemia clínica trata-se de uma patologia do foro metabólico que consiste na descida dos valores séricos de cálcio, predispondo os bovinos de aptidão leiteira a estados parésicos com manutenção do decúbito. O momento do parto e o período puerperal representa um enorme desafio para os mecanismos homeostáticos dos bovinos leiteiros. Com o início da lactogénese, os bovinos ficam expostos ao aumento da libertação de cálcio através da síntese de colostro e aumento da atividade da glândula mamária. Devido ao aumento brusco da remoção de cálcio das reservas celulares apenas o controlo homeostático rígido sobre o mineral possibilita reverter a incidência de hipocalcemia. Apesar do rígido controlo sobre o cálcio, há bovinos que apresentam níveis de cálcio inferiores aos valores de referência não manifestando sinais clínicos. Estes animais desenvolvem casos de hipocalcemia subclínica. Devido à ausência de sinais clínicos, os casos subclínicos podem significar uma porta de entrada para a incidência de patologias puerperais.

Devido à ação preponderante que o fósforo possui na homeostasia das vacas leiteiras, o seu papel é crucial. Com processos fisiológicos semelhantes e controlados pela mesma ação hormonal a interligação entre o cálcio e o fósforo, principalmente em casos de deficit em cálcio, não deve ser descurada.

Com o presente trabalho pretendeu-se diagnosticar a percentagem da incidência de hipocalcemia subclínica em duas explorações e a sua interligação com 4 patologias puerperais: metrite, mastite, deslocamento de abomaso à esquerda e retenção placentária. Pretendeu-se também evidenciar a interligação entre o cálcio e o fósforo.

Para tal, procedeu-se à recolha de 50 amostras sanguíneas até 48 horas pós-parto para quantificação do cálcio total e fósforo inorgânico.

Os resultados mostraram que entre 65 a 80 % dos animais do estudo apresentavam hipocalcemia subclínica. Foi igualmente possível demonstrar a correlação positiva entre casos de hipocalcemia subclínica com a incidência de metrite e mastite. Estatisticamente, não foi possível correlacionar a interação entre o cálcio e o fósforo.

Foi possível concluir que a dieta com elevados níveis de cálcio pode ter estado na origem da elevada percentagem de animais com hipocalcemia subclínica. Conclui-se também que animais com hipocalcemia subclínica estão mais predispostos à incidência de patologias do puerpério.

Palavras chave: hipocalcemia subclínica, cálcio, fósforo, patologias pós-parto;

Abstract

Clinical hypocalcaemia is a metabolic pathology that consists in a decrease of serum calcium values, predisposing dairy cattle to paretic states with maintenance of the decubitus. The time of calving and the puerperal period represents an enormous challenge for the homeostatic mechanisms of dairy cattle. With the onset of lactogenesis, cattle are exposed to increased calcium release through colostrum synthesis and increased mammary gland activity. Due to the sudden increase in calcium exit's from cellular reserves, only a strict homeostatic control over the mineral makes it possible to reverse the incidence of hypocalcaemia. Despite strict control over calcium, there are cattle that have calcium levels below the reference values and do not show clinical signs. These animals develop cases of subclinical hypocalcaemia. Due to the absence of clinical signs, subclinical cases may represent a gateway for the incidence of puerperal pathologies.

Due to the predominant action that phosphorus has on homeostasis of dairy cows, its role is crucial. With similar physiological processes and controlled by the same hormonal action, the interconnection between calcium and phosphorus, especially in cases of calcium deficit, should not be overlooked.

This work aimed to diagnose the percentage of the incidence of subclinical hypocalcaemia in two herds and its interconnection with 4 puerperal pathologies: metritis, mastitis, left displacement of abomasum and retained placenta. It was also intended to highlight the interconnection between calcium and phosphorus.

To this end, 50 blood samples were collected up to 48 hours postpartum to quantify total calcium and inorganic phosphorus.

The results showed that between 65 to 80% of the animals in the study had subclinical hypocalcaemia. It was also possible to demonstrate the positive correlation between cases of subclinical hypocalcaemia with the incidence of metritis and mastitis. Statistically, it was not possible to correlate the interaction between calcium and phosphorus.

It was possible to conclude that the high calcium diet may have been responsible for the high percentage of animals with subclinical hypocalcaemia. It is also concluded that animals with subclinical hypocalcaemia are more predisposed to the incidence of pathologies of the puerperium.

Keywords: subclinical hypocalcemia, calcium, phosphorus, post-partum diseases;

Abreviaturas

- ✓ **1,25 D3:** 1,25-di-hidroxitamina D3;
- ✓ **BPM:** Batimentos por minuto;
- ✓ **CT:** Calcitonina;
- ✓ **Ca:** Cálcio;
- ✓ **DAE:** Deslocamento de Abomaso à Esquerda;
- ✓ **dL:** Decilitro;
- ✓ **FGF23:** Factor de crescimento de fibroblastos 23;
- ✓ **g:** Gramas;
- ✓ **K:** Potássio;
- ✓ **Kg:** Quilograma
- ✓ **Na:** Sódio;
- ✓ **OCPC:** o-Cresolftaleina complexona;
- ✓ **P:** Fósforo;
- ✓ **PTH:** Paratormona
- ✓ **Vac. A:** Vacaria A;
- ✓ **Vac. B:** Vacaria B.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. Relatório de estágio | 11 |
| 2. Introdução..... | 18 |
| 3. Revisão Bibliográfica | 21 |
| 4. Cálcio | 22 |
| 4.1. Homeostasia do Cálcio | 25 |
| 4.1.1. Paratormona (PTH) | 27 |
| 4.1.2. Calcitonina | 29 |
| 4.1.3. Vitamina D 3 (1,25 dihidroxicolecalciferol) | 29 |
| 4.2. Sinais clínicos de hipocalcémia..... | 30 |
| 4.3. Fatores predisponentes à incidência de hipocalcémia..... | 32 |
| 4.3.1. Fatores metabólicos..... | 32 |
| 4.3.2. Raça | 32 |
| 4.3.3. Idade e número de partos | 33 |
| 4.3.4. Alimentação | 33 |
| 5. Fósforo..... | 34 |
| 5.1. Papel do fósforo na fisiologia dos bovinos de leite..... | 34 |
| 5.2. Fisiologia do fósforo | 35 |
| 5.2.1. Paratormona (PTH) | 36 |
| 5.2.2. 1,25-di-hidroxivitamina D3 (1,25 D3) | 37 |
| 5.2.3. Fosfatoninas (FGF23) | 38 |
| 5.3. Cálcio vs Fósforo | 39 |
| 5.4. Papel do Fósforo num Caso de Hipocalcémia Clínica | 41 |
| 6. Hipocalcémia Subclínica..... | 41 |
| 6.1. Consequências da hipocalcémia subclínica..... | 43 |
| 6.1.1. Influência do cálcio nos deslocamentos de abomaso | 43 |
| 6.1.2. Influência do cálcio nas mastites..... | 44 |
| 6.1.3. Influência do cálcio nas retenções placentárias e metrites | 44 |
| 7. Objetivos | 45 |
| 8. Material e Métodos..... | 46 |
| 8.1. Caracterização das explorações | 46 |
| 8.1.1. Alimentação | 46 |
| 8.2. Desenho experimental..... | 47 |
| 8.2.1. Avaliação clínica..... | 47 |
| 8.2.2. Critérios de Inclusão | 48 |
| 8.2.3. Critérios de exclusão | 48 |
| 8.3. Metodologia | 49 |
| 8.3.1. Metodologia para determinação dos níveis de cálcio | 51 |

| | | |
|---------|--|----|
| 8.3.2. | Metodologia para determinação dos níveis de fósforo inorgânico..... | 52 |
| 9. | Análise estatística | 54 |
| 9.1.1. | Teste de Shapiro-Wilkks..... | 55 |
| 9.1.2. | Teste de Qui-quadrado para intervalo de hipocalcemia de 5,5 – 8 mg/dl e intervalo de 5,5 – 8,5 mg/dl..... | 55 |
| 9.1.3. | Teste T de formulação de hipóteses | 55 |
| 10. | Resultados | 56 |
| 10.1. | Valores de calcemia na Vacaria A | 56 |
| 10.2. | Incidência de patologias no período do puerpério na vacaria A | 57 |
| 10.2.2. | Deslocamento de abomaso à esquerda..... | 58 |
| 10.2.3. | Mastite | 58 |
| 10.2.4. | Retenção placentária..... | 58 |
| 10.3. | Valores de calcemia da vacaria B | 59 |
| 10.4. | Incidência de patologias no período do puerpério na vacaria B | 60 |
| 10.4.1. | Metrite | 60 |
| 10.4.2. | Deslocamento de abomaso à esquerda..... | 61 |
| 10.4.3. | Mastite | 61 |
| 10.4.4. | Retenção Placentária..... | 61 |
| 10.5. | Intervalo de referência para hipocalcemia subclínica entre 5,5 até 8,5 mg/dl. 62 | |
| 10.5.1. | Valores de calcemia da Vacaria A | 62 |
| 10.5.2. | Incidência de patologias no período do puerpério na vacaria A..... | 63 |
| 10.5.3. | Valores de Calcemia da Vacaria B | 64 |
| 10.5.4. | Incidência de patologia no período do puerpério na vacaria B..... | 65 |
| 10.6. | Correlação entre os valores de fósforo e os valores de cálcio na vacaria A | 66 |
| 10.7. | Correlação entre os valores de fósforo e os valores de cálcio na vacaria B..... | 67 |
| 11. | Discussão | 69 |
| 12. | Conclusão | 78 |
| 13. | Bibliografia | 80 |
| 14. | Anexos | 84 |

Índice de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Ações veterinárias separadas por espécies | 12 |
| Tabela 2- intervenções profiláticas..... | 13 |
| Tabela 3- Intervenções cirúrgicas..... | 14 |
| Tabela 4- intervenções do foro reprodutivo | 15 |
| Tabela 5- casos clínicos do aparelho digestivo | 15 |
| Tabela 6- intervenções veterinárias sobre o aparelho digestivo | 16 |
| Tabela 7- casos clínicos do aparelho respiratório..... | 16 |
| Tabela 8- casos clínicos do aparelho músculo-esquelético | 16 |
| Tabela 9- casos clínicos da glândula mamária | 17 |
| Tabela 10- intervenções veterinárias no âmbito da vacaria..... | 17 |
| Tabela 11- Intervalos de referência de normocalcemia para os diferentes autores. | 24 |
| Tabela 12- intervalos de referência para casos de hipocalcemia subclínica para diferentes autores | 42 |
| Tabela 13- Distribuição da Incidência de Patologias em Animais com Valores de Ca Compreendidos entre 5,5 – 8,5 mg/dl na vac. A | 63 |
| Tabela 14- Estatística Descritiva dos Valores de Cálcio das duas Vacarias | 54 |
| Tabela 15- Teste de Qui-Quadrado entre Ca vs Metrite da vac. B..... | 60 |
| Tabela 16- Teste de Qui-Quadrado entre Ca vs Metrite da vac. B..... | 65 |
| Tabela 17- Teste de Qui-Quadrado entre Ca vs Mastite da vac. A | 63 |
| Tabela 18- Teste T de Comparação entre as Médias de Ca vs Médias do P, na vac. A | 66 |
| Tabela 19- Teste T de Comparação entre as Médias de Ca vs Médias do P, na vac. B | 68 |

Índice ilustrativo

| | |
|---|----|
| Figura 1- Esquema de utilização do cálcio no período do peri-parto num bovino leiteiro de 600 kg (adaptado de (Corbellini, 1998) | 25 |
| Figura 2- Esquemática da Homeostasia do Cálcio (adaptado de(Reinhardt, Horst, & Goff, 1988) | 27 |
| Figura 3- Esquema da Homeostasia do Cálcio(adaptado de (Song, 2017) | 30 |
| Figura 4- Esquemática da Homeostasia do Fósforo (adaptado de (T. A. Reinhardt et al., 1988) | 39 |
| Figura 5- Tubos Colectores Simples a Vácuo sem Aditivos com Agulha de 18 G após Recolha da Amostra Sanguínea (original do autor) | 49 |
| Figura 6- Amostra de Soro Sanguíneo após Centrifugação e Separação do Sangue Total (original do autor) | 50 |

| | |
|--|----|
| Figura 7- Tiras Reativas para Quantificação do Fósforo Inorgânico e Cálcio, respetivamente (original do autor) | 50 |
| Figura 8- Analisadora SPOTCHEM EZ com as Tiras Reativas para Posterior Análise (original do autor) | 51 |
| Figura 9- Kit para Medição do Cálcio Total com Cartão para Realização do Protocolo de Calibração (original do autor) | 52 |
| Figura 10- Kit para Medição do Fósforo Inorgânico com Cartão para Realização do Protocolo de Calibração (original do autor) | 53 |
| Figura 11- Amostra de Soro Sanguíneo com Evidência de Hemólise (original do autor) | 69 |

Índice de Gráficos

| | |
|---|----|
| Gráfico 1- Ações veterinárias separadas por espécies..... | 12 |
| Gráfico 2- Casos clínicos de bovinos | 17 |
| Gráfico 3 - Incidência de Patologias em Animais com Valores de Calcémia superiores a 8 mg/dl; | 59 |
| Gráfico 4 - Distribuição dos Animais da vac. B pelos Intervalos dos Valores de Cálcio. | 60 |
| Gráfico 5 - Incidência de Patologias em Animais com Valores de Calcémia entre 5,5 – 8 mg/dl | 61 |
| Gráfico 6 - Incidência de Patologias em Animais com Valores de Calcémia superiores a 8 mg/dl. | 62 |
| Gráfico 7 - Distribuição dos Animais da vac. A pelos Intervalos dos Valores de Cálcio | 62 |
| Gráfico 8 - Distribuição da Incidência de Patologias em Animais com Valores de ca Compreendidos entre 5,5 – 8,5 mg/dl na vac. A | 64 |
| Gráfico 9 - Distribuição dos Animais da vac. B pelos Intervalos dos Valores de Cálcio | 64 |
| Gráfico 10 - Distribuição da Incidência de Patologias em Animais com Valores de ca Compreendidos entre 5,5 – 8,5 mg/dl na vac. B | 65 |
| Gráfico 11 - Correlação entre os Valores de Fósforo e os Níveis de Calcémia dos Animais da vac. A | 67 |
| Gráfico 12 - Correlação entre os Valores de Fósforo e os Níveis de Calcémia dos Animais da vac. B..... | 68 |

1. Relatório de estágio

No âmbito da conclusão do mestrado integrado em Medicina Veterinária da faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias é nos apresentado uma nova etapa de formação com o objetivo final de conclusão do mestrado integrado: Estágio curricular.

O meu estágio curricular teve a duração de quatro meses, decorrentes desde o dia dez de setembro de 2018 até ao seu termino em dez de janeiro de 2019. O exercício do estágio foi realizado sobre a temática da área de clínica de espécies pecuárias. A escolha prendeu-se pela eleição e gosto pessoal pela área científica, neste caso particular em bovinos de aptidão leiteira, maioritariamente. Por iniciativa, elegi como meu orientador externo de estágio o Dr. Gonçalo Ortega, o qual acompanhei nas suas atividades profissionais diárias durante o período de realização do estágio.

O estágio decorreu principalmente na zona oeste de Lisboa, com presença diária e acompanhamento dos casos e do quotidiano de 2 vacarias localizadas no concelho de Loures, onde o meu orientador é veterinário residente. Os casos exteriores ao âmbito do funcionamento das vacarias foram decorrentes maioritariamente na zona oeste, com casos esporádicos de visitas à região do Alentejo.

Por se tratar do acompanhamento de um veterinário residente, com presença assídua, principalmente em duas vacarias, foi possível a realização e acompanhamento dos diagnósticos, o contacto e aprendizagem dos métodos para alcançá-los, interação com procedimentos e intervenções veterinárias para os determinados casos, acompanhamento dos casos e contacto com as suas evoluções, permitindo constatar o antes, o durante e os pós das inúmeras casuísticas onde o Médico Veterinário atua.

Em plano secundário, e menor número, foram realizadas intervenções em caprinos, ovinos e suínos, direcionadas principalmente para ações de sanidade de rebanho. No decorrer do estágio foi também possível contactar tanto com canídeos, bem como com equídeos, através de ações de vacinação, colocações de chips, entre outras.

Discriminando os casos com os quais contactei no decorrer do estágio, optei por uma descrição, diferenciando as espécies e o número/tipo de casos/intervenções vistas ou realizadas. Aquando da descrição dos casos dos bovinos, optei por uma discriminação mais detalhada dos casos e ações realizadas por se tratar da espécie principal e com maior preponderância sobre o meu estágio.

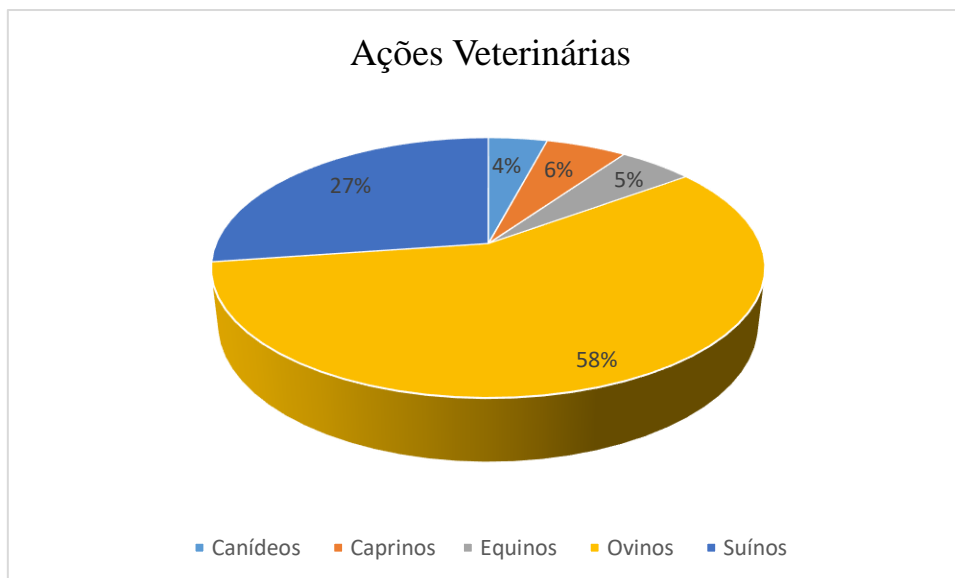


Gráfico 1- Ações veterinárias separadas por espécies

Em suma, no decorrer do estágio, eu realizei 462 intervenções veterinárias, repartidas por canídeos, caprinos, equinos, ovinos e suínos.

Tabela 1- Ações veterinárias separadas por espécies

| <i>Espécie</i> | <i>Intervenções Veterinárias</i> |
|-----------------|---|
| <i>Canídeos</i> | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Claudicação: 1 animal (Do membro anterior esquerdo); ➤ Colocação de Microchip: 3 animais; ➤ Colheita de amostras sanguíneas para pesquisa de Leishmaniose: 4 animais; ➤ Vacinação antirrábica: 10 animais; ➤ Vacinação parvovirose: 1 animal. |
| <i>Caprinos</i> | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Colheita de amostras sanguíneas para realização de sanidade de rebanho: 15 animais; ➤ Colheita de amostras sanguíneas para pesquisa de agentes causadores de abortos: 10 animais; ➤ Traumatismo craniano: 1 animal; |
| <i>Equinos</i> | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Colocação de Microchip: 12 animais; |

| | |
|---------------|--|
| | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Resenha: 12 animais; |
| <i>Ovinos</i> | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Colheita de amostras sanguíneas para realização de sanidade de rebanho: 215 animais; ➤ Colocação de chip's e brincagem: 50 animais ➤ Necropsia: 2 animais; |
| <i>Suínos</i> | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Colheita de amostras sanguíneas para pesquisa Aujeszky e confirmação do protocolo vacinal: 126 animais, entre reprodutoras, marrãs e varrascos. |

Bovinos

A área e a espécie onde experienciei mais intervenções no decorrer deste estágio foram os bovinos, neste caso em concreto em bovinos de aptidão leiteira. As intervenções veterinárias experienciadas foram principalmente realizadas no quotidiano de 2 vacarias. Estas permitiam abranger praticamente todos os sistemas fisiológicos do animal nas suas diversas áreas.

Ao nível do plano profilático

As intervenções prendem-se principalmente por ações de vacinação direcionadas para patologias dos sistemas respiratório e reprodutor e prevenção de patologias da glândula mamária.

Tabela 2- intervenções profiláticas

| Intervenções veterinárias | Nº de animais |
|---|----------------------|
| Vacinação para mastites | 42 |
| Vacinação para IBR e BVD | 20 |
| Necropsia | 13 |
| Recolha de amostras sanguíneas em vitelos para medição dos sólidos séricos totais | 82 |

Ao nível da clínica cirúrgica

Desde a opção da decisão de avançar para cirurgia através do diagnóstico, a preparação do animal, os procedimentos de anestesia, a preparação do campo cirúrgico, realização da cirurgia e pós

cirúrgico foi possível acompanhar 20 casos. O maior número de cirurgias foi direcionado sobre o aparelho digestivo, com a realização de abomasopexia com acesso paralombar esquerdo. Outra intervenção cirúrgica que assumiu um número relevante de casos foi a cesariana, com 3 cirurgias. Dos 3 casos, dois episódios foram resultados do tamanho excessivo dos vitelos associado a má apresentação. O outro caso resultou numa má apresentação do vitelo (apresentando-se torcido) que conseqüentemente, devido à compressão dos vasos e tecidos pelo esforço de entrada em trabalho de parto levou a edema vulvar da progenitora.

Tabela 3- Intervenções cirúrgicas

| Intervenções Veterinárias | Nº de animais |
|----------------------------------|----------------------|
| Abomasopexia paralombar esquerda | 12 |
| Partos distócicos/Cesariana | 3 |
| Amputação de cauda | 1 |
| Drenagem de abscessos | 4 |

Ao nível dos casos clínicos com os quais contactei foi possível contactar com quase todos os sistemas dos bovinos. A apresentação da casuística que contactei foi dividida pelas intervenções veterinárias consoante os aparelhos afetados ou área de intervenção e os casos clínicos que justificaram tais ações:

Controlo reprodutivo: com o acompanhamento do veterinário residente das vacarias foi possível, através de visitas semanais com o propósito do controlo reprodutivo dos animais, a palpação dos mesmos com o intuito de realizar a avaliação do período pós-parto, diagnósticos de gestação nas suas diferentes fases e acompanhamento do estado e evolução reprodutiva dos animais, tanto primíparas como vacas múltíparas. Devido à implementação de um programa reprodutivo no âmbito das duas vacarias, é também realizado a avaliação do sistema reprodutivo dos animais, com estadiamento das diferentes fases do ciclo reprodutivo dos bovinos e seguimento do protocolo implementado com controlo da atividade ovárica dos animais.

Tabela 4- intervenções do foro reprodutivo

| Casos clínicos | Nº de animais |
|--------------------------------------|----------------------|
| Prolapso vaginal | 1 |
| Fetos mumificados | 2 |
| Metrites | 67 |
| Retenção placentária | 22 |
| Edema da vagina | 4 |
| Intervenções veterinárias | Nº de animais |
| Manobras obstetrícias | 19 |
| Inseminação artificial | 29 |
| Colocação de medicação intra-uterina | 22 |
| Lavagem uterina | 53 |

Aparelho digestivo: Devido ao grande número de vitelos em ambas as explorações, grande parte das ações realizadas recaem sobre estes, onde as diarreias neonatais encabeçam a lista de casos visualizados:

Tabela 5- casos clínicos do aparelho digestivo

| Casos clínicos | Nº de animais |
|----------------------------------|----------------------|
| Diarreia neonatal | 96 |
| Reticulo-pericardite traumática | 1 |
| Timpanismo gasoso | 3 |
| Acidose ruminal | 17 |
| Gastrite com evidência de melena | 1 |
| Enterite hemorrágica | 1 |
| Indigestão | 6 |

Tabela 6- intervenções veterinárias sobre o aparelho digestivo

| Intervenções veterinárias | Nº de animais |
|--|----------------------|
| Entubação oro-gástrica (vitelos) | 3 |
| Entubação oro-gástrica (vacas) para administração de soluções estimulantes da ruminação (ruminatórios) | 28 |
| Colocação de acesso venoso e administração de soro (vitelos) | 17 |

Aparelho respiratório: ao nível do aparelho respiratório a pneumonia assume a maior frequência, tanto ao nível de animais adultos como ao nível de vitelos.

Tabela 7- casos clínicos do aparelho respiratório

| Casos clínicos | Nº de animais |
|-----------------------|----------------------|
| Pneumonia | 12 |

Aparelho músculo-esquelético: ao nível do aparelho músculo-esquelético foi possível contactar com diversos casos onde os animais apresentavam claudicação e dificuldade de deslocação. No entanto, devido à falta de recursos, a avaliação da saúde podal dos animais era feita por uma empresa exterior à vacaria, sendo apenas realizada a manutenção após os animais serem vistos.

Tabela 8- casos clínicos do aparelho músculo-esquelético

| Casos clínicos | Nº de animais |
|---|----------------------|
| Fratura do membro anterior direito com colocação de tala (vitelo) | 1 |
| Úlcera de sola | 2 |
| Dermatite interdigital | 7 |

Glândula mamária: apesar da implementação do plano profilático, este não consegue abranger nem é direccionado para todos os agentes devido ao número elevado de agentes etiológicos passíveis de causar afeções ao nível da glândula mamária. Assim no decorrer do estágio foi possível contactar com alguns casos de mastites e com a sua abordagem terapêutica.

Tabela 9-casos clínicos da glândula mamária

| Casos clínicos | Nº de animais |
|----------------|---------------|
| Mastites | 16 |

Com o acompanhamento diário das duas vacarias, foi-me permitido o contacto com tarefas que são usuais, mas que assumem um papel preponderante para a saúde das instalações. Foi-me também possibilitado a recolha de dados para a conclusão da minha tese de mestrado, requerendo a recolha de amostra dos animais após estes concluírem o trabalho de parto.

Tabela 10- intervenções veterinárias no âmbito da vacaria

| Intervenções veterinárias | Nº de animais |
|---|---------------|
| Recolha de amostras sanguíneas | 100 |
| Tratamento de dados e colocação no programa informático de gestão da exploração | |
| Acompanhamento do processo de ordenha | |

Em suma, no decorrer do estágio pude contactar com 260 casos clínicos sobre bovinos, maioritariamente de aptidão leiteira.

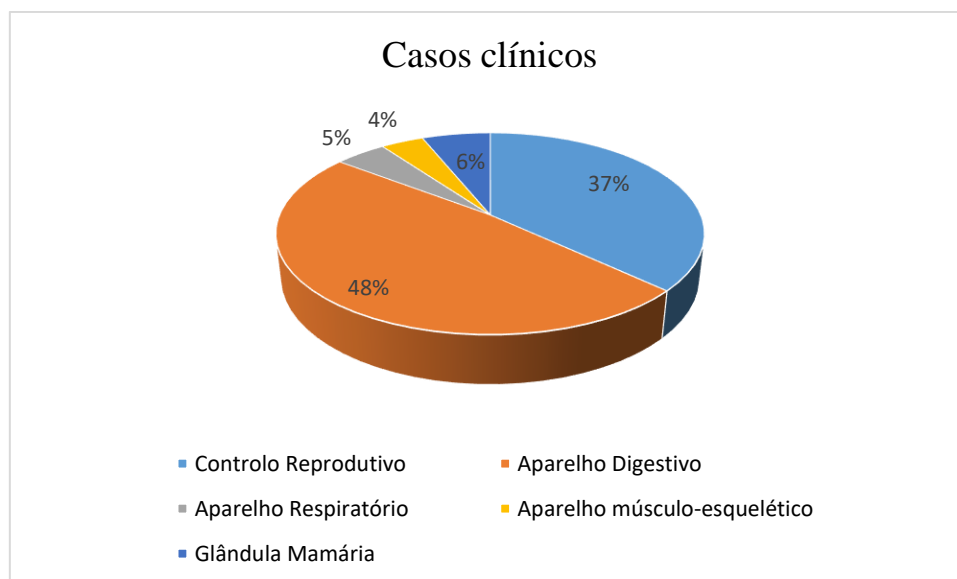


Gráfico 2- Casos clínicos de bovinos

2. Introdução

Os avanços na nutrição e no manejo do gado bovino de aptidão leiteira minimizaram significativamente os desequilíbrios macro minerais na dieta capazes de causar deficiências clínicas. No entanto, distúrbios subclínicos perpetuam, em maior escala, a sua influência na saúde e desempenho das vacas leiteiras, consequência das adaptações hormonais e metabólicas associadas ao período seco e ao início da lactação colocando em causa a homeostase dos animais (Neves et al., 2017). Com o avançar dos tempos, as vacas foram submetidas a uma intensa seleção genética com o objetivo de aumentar a produção leiteira. Porém estas melhorias genéticas estão associadas a um aumento dos problemas a nível da saúde reprodutiva e produtiva das vacas. Os bovinos de aptidão leiteira, em alguma fase da sua vida produtiva experienciam um deficit mineral, principalmente e com maior destaque na altura do parto. Em diversos casos esta carência vai traduzir-se no surgimento de sinais clínicos ou subclínicos de hipocalcémia. Com maior incidência nas primeiras duas a três semanas de lactação, e com o parto aliado ao início e aumento da lactogénese a constituírem enormes desafios fisiológicos aos mecanismos homeostáticos da vaca, o aumento da necessidade em cálcio (Ca) na altura em torno do parto prende-se, principalmente, com o crescente e súbito aumento da atividade da glândula mamária (Goff, 2006; Rodríguez et al., 2017). Considerada uma das fases mais críticas da lactação para uma vaca leiteira (Horst et al., 2018), o fator que impera é que a vaca *peri parturiente* sofre uma transição importante na altura do parto, passando de um estado gestante não-lactante para um estado não-gestante lactante.

A hipocalcémia clínica, também conhecida por *paresia puerperalis*, consiste num distúrbio metabólico onde os mecanismos homeostáticos e o suprimento dietético não conseguem manter as concentrações normais de Ca gerando assim uma carência mineral que se traduz na incapacidade do animal se erguer (Horst et al., 2011). Etiologicamente falando, a hipocalcémia ocorre principalmente devido ao início súbito da produção de leite que resulta numa depleção aguda do Ca sérico ionizado devido a um aumento repentino da necessidade do aporte do mineral para suprimento dos processos fisiológicos. No parto, devido ao aumento abrupto da necessidade de nutrientes associado aos seus efeitos hormonais e à expressão de fatores de transcrição, vai originar perturbações significativas na homeostase mineral, condicionando diversas alterações nas concentrações minerais sanguíneas das vacas durante o período pós-parto (Kincaid, 2008). Porém, há animais onde ocorrem falhas nos mecanismos de manutenção e controlo da homeostasia que vão resultar, posteriormente, numa depleção e deficiência de certos minerais que colocam em risco a saúde reprodutiva e produtiva das vacas de leite. Colocando em causa a homeostasia dos sistemas vitais das vacas, o facto da diminuição da quantidade de Ca e do fósforo (P) na altura do parto, e a necessidade contínua dos mesmos, associada a uma maior demanda

aquando do início da lactação levam a que a hipocalcémia em ambas as suas vertentes (clínica e subclínica) devam ser consideradas as portas de entrada para diversas patologias que reduzem substancialmente a produtividade dos animais e conduzem para diversas complicações futuras.

No entanto, o facto de os animais apresentarem níveis séricos de Ca inferiores aos valores de referência não se traduz obrigatoriamente na ocorrência de um caso de hipocalcémia clínica. O facto da incidência da hipocalcémia clínica se traduzir numa percentagem baixa, onde, estaticamente falando, estima-se que esteja presente em 5% dos animais, não significa que o animal não possa apresentar níveis inferiores aos dos intervalos definidos de referência (Rodríguez et al., 2017). Tal facto prende-se com a incidência de casos de hipocalcémia subclínica.

A hipocalcémia subclínica consiste na diminuição dos valores de Ca sérico a níveis inferiores ao intervalo de referência sem apresentar os sinais e sintomas clínicos normalmente apresentados num quadro de hipocalcémia clínica. Com a presença de um quadro subclínico, diferentes autores como (DeGaris & Lean, 2008; Rodríguez et al., 2017) defendem que existe uma diminuição da capacidade de contração da musculatura lisa associada a uma diminuição da motilidade ruminal e abomasal, redução da ingestão de matéria seca e da produção de leite no início da lactação, predispondo os animais para o desenvolvimento de patologias do foro produtivo como mastites e deslocamentos de abomaso.

Com a prevalência superior aos quadros da hipocalcémia clínica, os episódios colocam em causa a saúde reprodutiva da(s) vaca(s). A incidência da doença representa importantes perdas económicas nas explorações leiteiras de todo o mundo. Bibliograficamente, cada caso clínico de “vaca caída” por hipocalcémia custa sensivelmente 200 euros ao produtor, sem somar os custos das consequências que possam advir no futuro do animal (Neto, 2009). O valor acresce substancialmente devido ao custo dos tratamentos, do refugo precoce, das mortes e das complicações secundárias que podem surgir como atonia ruminal, mastite clínica, retenção de placenta, metrite, degeneração e necrose das células musculares (em especial membros posteriores), pneumonia por aspiração, etc.

O fator que impera é o facto da patologia ao não ser diagnosticada e posteriormente, o animal não receber qualquer tratamento direcionado, faz com que o futuro reprodutivo e produtivo do animal seja colocado em “jogo”. Citando diversas fontes bibliográficas, a correlação negativa entre diversos parâmetros reprodutivos como o corrimento vaginal e a involução uterina, a incidência da carência mineral vai traduzir-se em perdas económicas ao nível reprodutivo. Por se tratar de bovinos de aptidão leiteira, parâmetros como os dias em aberto e o tempo de involução uterina e posterior inseminação/conceção são elementos chave para a saúde económica das explorações. Aliado ao fator da soma dos custos sobre os tratamentos que esses animais podem estar sujeitos

leva a que a hipocalcemia subclínica pese, e muito, na “saúde” de uma exploração (Blaine et al., 2015).

Inerente à diminuição do Ca no pool plasmático sanguíneo pode estar subjacente a carência de outro mineral: o P. O controlo homeostático destes principais minerais resulta de um equilíbrio intrincado de entrada, saída e reciclagem de nutrientes, onde ambos são fornecidos ao animal, principalmente pela dieta. O facto de serem controlados pelos mesmos mecanismos e estarem interligados na homeostasia dos sistemas vitais dos bovinos leva a que a diminuição do Ca possa estar associada, concomitantemente com a diminuição do P.

Controlado de forma menos restrita pelos animais, o P pode ser um dos culpados para a perpetuação de um quadro de “vaca caída”, mesmo após a implementação de qualquer forma de tratamento. A ação do P nos mecanismos de homeostasia do Ca pode passar despercebida, nunca devendo ser descurada a interligação entre ambos os minerais, acabando por resolver singularmente apenas uma das carências.

3. Revisão Bibliográfica

O balanço energético negativo e o desequilíbrio mineral que os animais experienciam precocemente no período pós-parto têm sido atribuídos a vários distúrbios, que comprometem a produtividade da vaca leiteira. Com o início da lactogênese aliado ao stress que as vacas experienciam relacionado com o período em torno do parto, provoca um estado de diminuição da capacidade da resposta imunitária colocando em causa os mecanismos responsáveis pela produção energética e homeostase mineral das vacas (Koch, 2013 citando Horst et al., 2010). Este período de transição, que inclui as três semanas antes e depois do parto, é caracterizado por um maior stress fisiológico e acarreta um risco elevado de alterações metabólicas (Goff, 2008; Mann, McArt, & Abuelo, 2019). As doenças metabólicas geralmente ocorrem quando o pico da produção está além da capacidade das reservas do animal para sustentar as suas necessidades metabólicas específicas. Devido principalmente, ao início súbito da lactação com a síntese de colostro, existe um escoamento de Ca sanguíneo com consequentemente um aumento brusco da necessidade do aporte de Ca para suprimento das funções fisiológicas das vacas (Mann et al., 2019). A alta demanda de nutrientes imposta ao corpo pelo aumento da atividade da glândula mamária nos bovinos de aptidão leiteira, no entanto nem sempre pode ser atendida, resultando na predisposição e/ou desenvolvimento de doenças metabólicas, como a hipocalcemia clínica.

A hipocalcemia clínica consiste na diminuição da concentração de Ca ao nível sanguíneo, conduzindo o animal a um estado parésico com manutenção de uma posição de decúbito esternal e sem capacidade para se erguer. Representando consequências graves para futuro produtivo e reprodutivo do animal, a hipocalcemia, em ambas as suas vertentes (hipocalcemia clínica e subclínica) devem ser consideradas as portas de entradas para diversas patologias que reduzem, substancialmente, a produtividade dos animais. Devido à importância que os minerais como o Ca, possuem na homeostasia dos sistemas vitais dos animais, constituindo-se como componentes essenciais e necessários para o normal funcionamento de uma ampla variedade de tecidos e processos fisiológicos, ao atuarem como por exemplo, para a formação óssea, contrações musculares, transmissão nervosa, metabolismo energético, mecanismos de coagulação do sangue, e como segundo mensageiro que regula a ação de um grande número de hormonas, leva a que os vertebrados, mantenham a sua homeostasia com notável precisão (Almeida, 2010).

Devido à ação que o Ca possui dentro dos sistemas vitais dos bovinos, onde influencia diretamente órgãos como diafragma, rúmen, pulmões, glândula mamária, fígado e útero, o estado pós-parturiente numa vaca, é caracterizado por alterações metabólicas drásticas que se podem traduzir num aumento de incidência de doenças e diminuição da eficiência do animal. Considerada uma “gateway disease”, a hipocalcemia, principalmente a subclínica, pode passar despercebida por nem sempre se associar aos sinais clínicos que surgem. Por se tratar da forma

subclínica e, portanto, mais difícil de diagnosticar, a hipocalcémia subclínica tem potencialmente maior impacto económico que a sua forma clínica, uma vez que afeta uma maior percentagem de animais e fica muitas vezes por tratar (Oetzel, 2012). Com o diagnóstico definitivo a prender-se unicamente pela análise e quantificação do Ca na amostra sanguínea, associado ao fator da vertente subclínica, leva a que a deficiência mineral possa passar sem realização de diagnóstico e consequentemente de tratamento.

Por se tratar de uma porta de entrada para diversas patologias, a incidência da hipocalcémia subclínica vai influenciar negativamente a vertente económica da(s) vacarias, justificando o elevado número de estudos sobre Ca.

4. Cálcio

O controlo homeostático sobre o ião Ca nos tecidos extracelulares é realizado de uma forma exigente e pormenorizada, devido à importância que o seu papel constitui na saúde animal e em especial destaque em bovinos de leite.

O ião Ca desempenha um papel fundamental nos processos biológicos de excitação neuromuscular, coagulação sanguínea, atividade enzimática, excitação nervosa, libertação hormonal, permeabilidade das membranas celulares e ainda é um componente estrutural do esqueleto.

A reserva de Ca sérico é composta por três diferentes formas:

- O Ca ionizado ou livre (50%)
- O Ca que se encontra no sangue, ligado a proteínas, principalmente à albumina (40-45%)
- O Ca ligado a outros iões formando complexos aniónicos como o citrato de Ca e principalmente, o fosfato de Ca (5-10%).

A forma ionizada é a única forma biologicamente ativa e a fração mais importante fisiologicamente, representando cerca de 50% da reserva de Ca total (Almeida, 2010).

Cerca de 99% do reservatório de Ca encontra-se nos dentes e ossos sob a forma de hidroxapatite. O Ca presente no osso encontra-se sob a forma de sais, principalmente CaHPO_4 (fosfato bicálcico) e outros sais de Ca amorfos. O osso contém Ca permutável que está em equilíbrio com a concentração sérica de Ca. Assim que existem pequenas variações na concentração, o controlo é feito numa primeira fase sem a ação hormonal, apenas, através da permuta de Ca com o osso, com o objetivo de reverter a situação (Koch, 2013).

No decorrer da gestação, uma das etapas mais importantes é o processo de secagem das vacas. No processo de secagem, as necessidades fisiológicas de Ca e P são residuais. Durante esse período, os requerimentos de Ca são mínimos e passam maioritariamente pelas necessidades de Ca ao nível fetal e fecal que residem, sensivelmente entre 10 a 12 g de Ca / d. Durante esse intervalo temporal, os mecanismos de reposição do Ca plasmático estão parcialmente ativos, suprimindo as necessidades fisiológicas dos animais (Horst et al., 2010). Este fator é um dos mais preponderantes, aquando do combate à hipocalcémia.

Reduzindo a quantidade de Ca fornecida às vacas através da dieta, na altura da secagem e em torno do parto, leva a que os mecanismos de controlo da homeostasia do Ca estejam ativos. Com as necessidades sobre o mineral a serem residuais devido ao processo da secagem, faz com os mecanismos fiquem ativos e consigam manter os níveis de Ca dentro dos intervalos de referência. Na altura do parto a vaca deve disponibilizar cerca de 30 g de Ca por dia para o pool sanguíneo. Como consequência dessa súbita necessidade de Ca, quase todas as vacas experimentam algum grau de hipocalcémia, durante o primeiro dia após o parto, uma vez que o intestino e o osso precisam de um período de adaptação para suprimir as demandas da lactação. Em alguns animais, a chamada de Ca, ao nível mamário faz com que as concentrações extracelulares e plasmáticas diminuam para níveis que perturbam a função neuromuscular, resultando num quadro clínico de hipocalcémia (Blaine et al., 2015).

Com o início da lactação, os processos fisiológicos precipitam-se e gera um aumento exponencial das necessidades minerais. A cascata de reações, leva bruscamente ao aumento da necessidade do suprimento de Ca e P que, por vezes, os animais não conseguem atender. Ao aumento da necessidade, somado o facto da diminuição da ingestão da matéria seca, próprio do período em torno do parto, predispõem os animais para incidência de casos de hipocalcémia.

Apesar do elevado número de estudos sobre a hipocalcémia em vacas leiteiras, os valores de normocalcémia não são consensuais. Diferentes autores apresentam intervalos variáveis de normocalcémia para os bovinos de aptidão leiteira.

Tabela 11- Intervalos de referência de normocalcemia para os diferentes autores.

| Autores | Intervalos de valores de Cálcio para animais normocalcémicos |
|---|---|
| (Rings, Rings, & Welker, 1997) | 8.8 a 10.4 mg/dl |
| Mateus & Lopes da Costa (2002) citado por (Almeida, 2010) | 2- 2,5 mmol/L ou 8-10 mg/dl |
| (Divers & Peek, 2008) | 2,13-2,5 mmol/L ou 8,5-10 mg/dl |
| (Goff, 2008) | 2.1–2.5 mmol/L. ou 8,5 a 10 mg/dl |
| (Reinhardt et al., 2011) | 8.42 a 11.22 mg/dl |
| (Song, 2017) | 8.8 a 10.4mg/dl |
| (Neves et al., 2017) | ≥ 8,5 mg/dl |

Com os valores de referência variáveis dentro das diferentes referências bibliográficas, vacas com níveis séricos de Ca total inferior a 8 mg/dl devem ser consideradas hipocalcémicas. Porém, o facto de os animais apresentarem níveis séricos de Ca inferior a 8mg/dl não se traduz obrigatoriamente na ocorrência de um caso de hipocalcemia clínica. Devido à diversidade de estudos sobre a incidência da hipocalcemia, permitiram aos veterinários e produtores um correto manejo dos animais de modo a diminuir os casos clínicos para valores residuais. A sua incidência, estatisticamente estima-se que esteja presente em 1% a 5% dos animais (Caixeta *et al*, 2017; Sedó et al, 2018) .

Com os níveis sanguíneos de normocalcemia de aproximadamente 8 a 8,5 até 12 mg / dl, isto significa que há aproximadamente 3,5 g de Ca (Ca ionizado) em todo o pool de plasma de uma vaca adulta com um peso de cerca de 600 Kg (Corbellini, 1998). Nos últimos 60 dias, as necessidades de Ca passam de cerca de 10 g/dia, para 15-20 g/diários direcionados para o feto. Coincidentes com o início da síntese de colostro, onde a concentração de Ca varia entre 2 a 3 g por litro produzido e aumento de contrações musculares que advém do período do parto levam à acentuação da depleção aguda dos níveis de Ca sérico ionizado (Goff & Horst, 1997).

Tudo somado, um animal produzindo cerca de 10 L de colostro perde aproximadamente 23 g de Ca, que foi transferido do sangue para a glândula mamária. Isto significa que 10 vezes mais Ca foi necessário do que a forma livre de Ca presente no plasma das vacas. Aliado às perdas que estão sempre inerentes no animal como as perdas urinárias e fecais, somente é possível manter o “pool” intercambiável de Ca (70-80 g/dia) através de uma maior eficiência nos mecanismos de controlo da homeostasia do Ca (Corbellini, 1998).

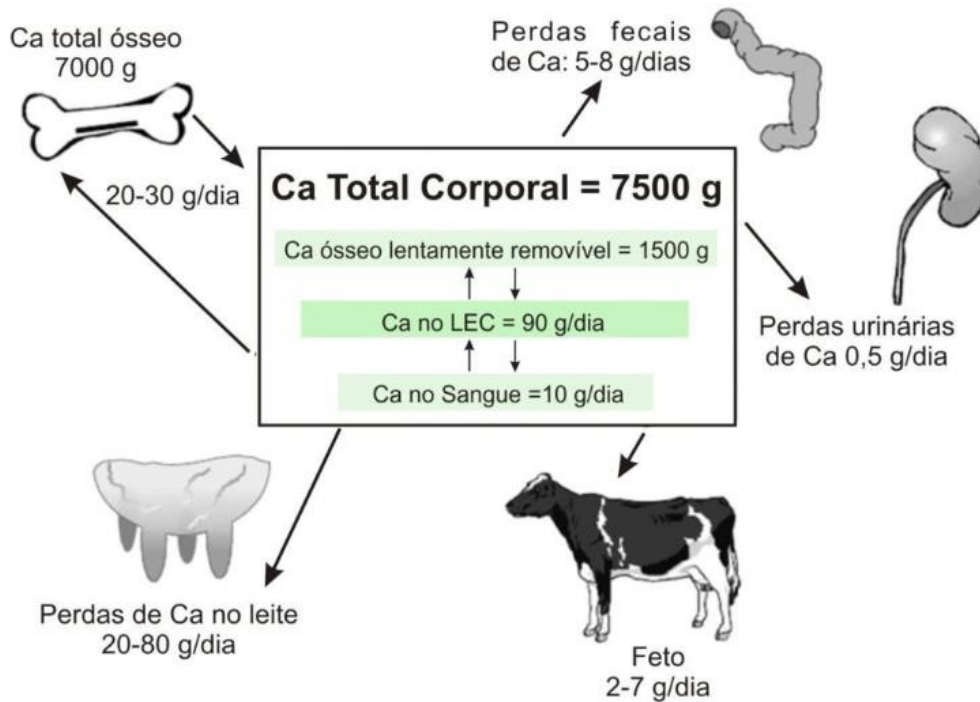


Figura 1- Esquema de utilização do cálcio no período do peri-parto num bovino leiteiro de 600 kg (adaptado de (Corbellini, 1998))

Os bovinos vão procurar, através de diversos mecanismos, a reposição dos níveis minerais. Para manter a normocalcémia em situações de necessidades tão elevadas, a vaca necessita de mobilizar dos locais de armazenamento, entre 20 e 30 g de Ca por dia nos primeiros dias de lactação. Para tal, os mecanismos de aumento da absorção intestinal e/ou aumento da reabsorção óssea são empregues, numa primeira fase, de modo a possibilitar ao animal o suprimento das suas necessidades e o alcance dos níveis de normocalcémia. Para atender à demanda do corpo, o Ca não é apenas absorvido pelo trato gastrointestinal, mas mobilizado também a partir das reservas no osso. A quantidade de Ca que pode ser mobilizada rapidamente a partir de reservas corporais foi estimada em 10 a 20 g, portanto, menos de 50% da necessidade diária (Rings et al., 1997).

As alterações são tão drásticas na altura do parto e as exigências demasiado elevadas que, apenas um controlo endócrino e metabólico muito eficaz permite a manutenção da concentração sanguínea de Ca dentro dos valores compatíveis com o normal funcionamento do organismo. Caso as vacas não consigam obter suficiente Ca através da mobilização óssea ou da dieta de modo a combater as perdas, estas irão desenvolver hipocalcémia clínica ou subclínica.

4.1. Homeostasia do Cálcio

Para reverter o estado de hipocalcémia, caso a situação não seja controlada numa primeira fase, os mamíferos irão ativar por intermédio do seu sistema endócrino, os mecanismos fisiológicos

onde através da interação de três hormonas principais visam obter os níveis desejados de Ca no sangue:

- Paratormona (PTH);
- Calcitonina (CT);
- 1,25-di-hidroxivitamina D3 (1,25 D3).

Exercendo as suas ações, principalmente e em maior grau, quando as reservas corporais do ião diminuem significativamente, estimulam a absorção gastrointestinal, a reabsorção ao nível ósseo e a reabsorção tubular renal para assim aumentar a sua atividade e conseqüentemente normalizar os níveis de calcémia (Blaine et al., 2015).

O Ca plasmático é controlado pelos esforços coordenados das hormonas calcitrópicas, PTH e 1,25 D3, ambas produzidas em resposta à hipocalcémia agindo com o intuito de aumentar a entrada de Ca no reservatório plasmático. Atuando sinergicamente, estas hormonas vão controlar estreitamente os níveis de Ca ionizado, promovendo sempre os valores de normocalcémia favoráveis para os sistemas fisiológicos dos animais. O controlo complexo do ião Ca prende-se pelo equilíbrio entre a estimulação da absorção por intermédio da hormona PTH e da 1,25 D3 e o controlo da excreção por parte da CT, interligando a sua ação com a interação de outras hormonas acessórias, como os corticosteróides, estrogénios, tiroxina, somatotropina e o glucagon conseguindo a homeostasia do ião Ca debaixo de certas condições.

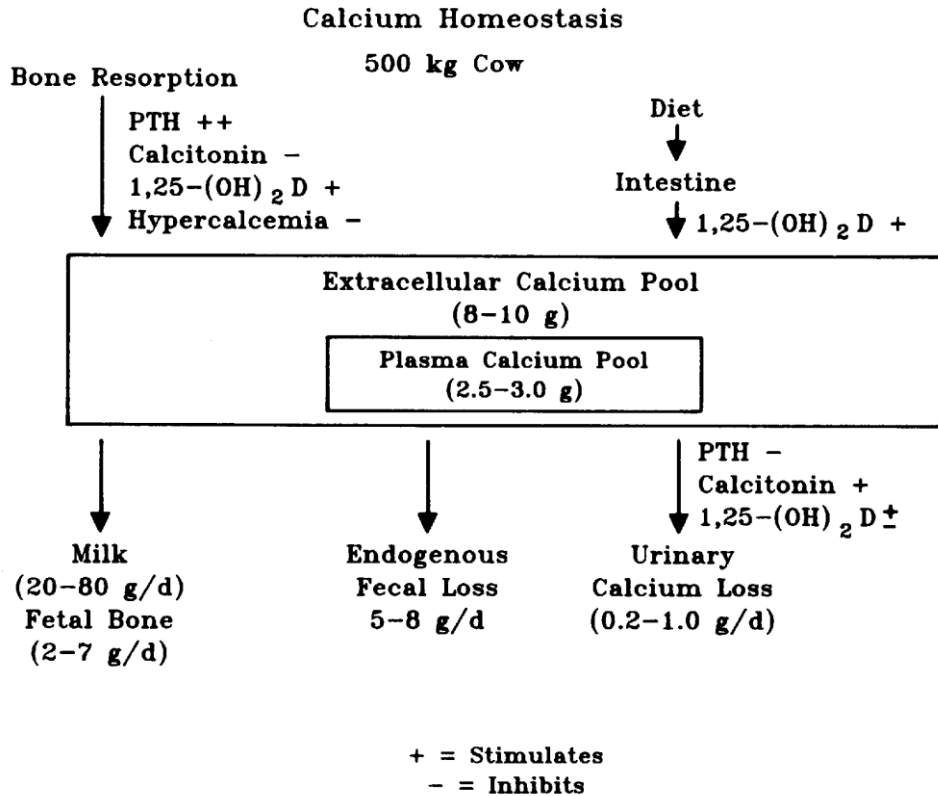


Figura 2- Esquemática da Homeostasia do Cálcio (adaptado de(Reinhardt, Horst, & Goff, 1988)

4.1.1. Paratormona (PTH)

É a principal hormona responsável pelo controlo e manutenção da homeostasia do Ca e P. Excretada pela paratiroide, com maior relevância em situações de hipocalcémia, vai influenciar diretamente as células-alvo no osso e rim, e indiretamente as do intestino, de forma a garantir um nível de normocalcémia sanguíneo ótimo para a funcionalidade dos sistemas fisiológicos do corpo.

A atuação da PTH visa o aumento da concentração plasmática de Ca de três maneiras: diretamente, estimula a reabsorção óssea e aumenta a absorção ativa de Ca ao nível renal. Indiretamente aumenta a absorção intestinal de Ca e P, atuado sinergicamente com 1, 25 D3 e promovendo a sua formação (Blaine et al., 2015) .

Numa fase inicial, esta hormona vai atuar prontamente a nível renal, aumentando a reabsorção através do filtrado glomerular. Ao nível ósseo, vai estimular a reabsorção do Ca ósseo, promovendo uma ativação celular obtendo como resultado uma mobilização de Ca ao nível da matriz óssea. As células secretoras de PTH vão monitorizar a concentração de Ca, ao nível do pool plasmático sanguíneo, através de recetores presentes nas suas membranas plasmáticas. Ligeiras variações, como a diminuição da concentração de Ca vão despoletar a produção hormonal através do aumento da ação da glândula paratiroide. Em casos de normocalcémia os

recetores das células secretoras de PTH possuem os locais de ligação de Ca ocupados e a secreção de PTH é basal (Reinhardt et al., 1988; Goff, 2006).

Os mecanismos homeostáticos dos animais, perante a presença e manutenção da carência mineral, vão atuar primeiramente a nível renal. Numa primeira fase, a absorção e filtração do Ca é realizada de forma passiva e livre ao nível dos túbulos contornados proximais e em menor percentagem no segmento ascendente da ansa de Henle. Consoante a manutenção do deficit mineral, os animais vão ativar os mecanismos homeostáticos para reverter a situação. Regidos pela ação sinérgica da PTH e 1,25 D3, os mecanismos de absorção e filtração do Ca ionizado, de maneira controlada, ocorrem nos túbulos contornados distais e túbulo coletor. Perante a presença dos recetores para a PTH, na superfície das estruturas, o aumento da produção da hormona precipita um aumento da expressão das proteínas envolvidas no transporte do Ca. O aumento de proteínas vai facilitar e consequentemente aumentar e otimizar a reabsorção de Ca ao nível renal (Goff, 2006).

Com a manutenção da hipocalcémia, a glândula paratiroide vai hipertrofiar, promovendo uma maior síntese e circulação da PTH, de modo a suprimir e responder às baixas concentrações do mineral. Ao nível ósseo, a hormona vai promover a reabsorção óssea, atuando ao nível dos osteócitos e osteoblastos como mecanismo para reverter o deficit mineral, inicialmente. Os osteoblastos ao serem estimulados pela secreção hormonal vão, intermediariamente, ativar a ação das citocinas. As citocinas têm como função ativar e promover a reabsorção ao nível ósseo por intermédio dos osteoclastos pré-existentes e estimulam a diferenciação de novos osteoclastos a partir das células progenitoras. Promovendo um estado de osteoporose lactacional, os animais vão mobilizar as suas necessidades de Ca do maior reservatório: Ca ósseo (Goff, 2008). A ação dos osteoblastos e a ativação completa do sistema de absorção leva vários dias a ficar completamente ativada. A ação dos osteócitos, numa fase primitiva da hipocalcémia, permite ao animal uma mobilização imediata do mineral, permitindo a tentativa de um controlo da carência mineral, numa fase mais precoce. Uma secreção de PTH prolongada pode resultar num aumento do número de osteoblastos resultando num aumento da osteogénese assim como da reabsorção óssea. Como a reabsorção óssea normalmente é superior à sua formação, vai traduzir-se numa mobilização de Ca (Koch, 2013).

Numa ação indireta, a PTH vai estimular a absorção intestinal de Ca e P, estimulando o aumento da formação e a ação da 1,25 D3 a nível renal que posteriormente vai atuar como intermediária, no transporte ativo, ao nível das células intestinais, promovendo a maior absorção de Ca. A descida dos níveis de Ca com posterior associação do aumento dos níveis de PTH, vai estimular a enzima renal 1-alfa-hidroxilase induzindo a sintetização de 1,25 D3 (Divers & Peek, 2008). Esta hormona vai melhorar a absorção ao nível dos recetores localizados na porção superior do trato

gastrointestinal, tornando o aproveitamento do Ca proveniente da dieta mais eficiente, ao nível do intestino delgado e prevenindo/diminuindo as perdas a nível urinário.

4.1.2. Calcitonina

Secretada pelas células C da tiróide, esta hormona, de cariz peptídico, tem a função de reduzir a concentração de Ca ao nível extracelular. Com a função de diminuir a concentração de Ca presente nos fluidos extracelulares, esta hormona vai atuar prontamente em duas vertentes. Vai diminuir a atividade osteoclástica, estimulada pela ação da PTH aquando da diminuição dos níveis de Ca sanguíneo, reduzindo os mecanismos que levam à reabsorção do Ca ao nível da matriz óssea (França, 2013).

Numa outra vertente, vai reduzir a atividade osteoclástica e osteoblástica, inibindo a formação de novos osteoclastos, privilegiando o equilíbrio entre a mobilização e deposição de Ca, ao nível ósseo.

Devido à função de combater o estado hipercalcémico, na concentração dos fluidos extracelulares, diferentes autores referem esta hormona como antagonista da PTH.

4.1.3. Vitamina D 3 (1,25 dihidroxicolecalciferol)

Sintetizada principalmente através da ação da exposição solar da pele aos raios UV, onde a ação dos raios solares converte um metabolito presente nas células epidermais num promotor da vitamina D, transformando esta em 1,25 D3. Posteriormente a este círculo, o metabolito resultante da exposição solar é convertido enzimaticamente, no fígado, em 25-hidroxivitamina D, a principal forma circulante de vitamina D, onde de seguida sofre um processo de hidroxilação pela enzima 1 α -hidroxilase no rim, passando assim para 1,25 (OH) D2, a forma biologicamente ativa de vitamina D ao nível renal (Divers & Peek, 2008).

Através da sua forma ativa, a vitamina D vai, principalmente, exercer a sua função ao nível de duas áreas. A ação primária, da 1,25 D3 é promover a absorção de Ca, ao nível intestinal. Estimulando a formação de proteínas de ligação ao Ca dentro das células epiteliais intestinais, mais propriamente localizadas na bordadura em escova, esta enzima vai potenciar o transporte ativo de Ca para pool plasmático, promovendo o aumento da concentração e uma maior eficiência e facilidade na difusão e transporte do mineral (Song, 2017).

Ao nível ósseo, a 1,25 D3 aumenta a reabsorção óssea induzindo células-tronco monocíticas, presentes na medula óssea, a diferenciarem-se posteriormente em osteoclastos. Também vai exercer a sua ação ao nível dos osteoblastos, estimulando estes a produzir citocinas e outros fatores que influenciam a atividade osteoclástica. Influenciando o aumento da osteogénese e a promoção da criação de osteoclastos vai conduzir a uma maior “captura” de Ca, por intermédio da reabsorção proveniente da matriz óssea.

Em menor escala, a ação da 1,25 D3 promove a menor excreção de Ca e do P, através das fezes e urina, favorecendo o reforço da reabsorção tubular renal de Ca, embora a quantidade total recuperada desta forma não seja muito significativa, uma vez que a excreção renal de Ca é muito reduzida. Ainda assim, vai conduzir a um maior reaproveitamento ao nível dos metabolitos resultantes da dieta. (Goff, 2008).

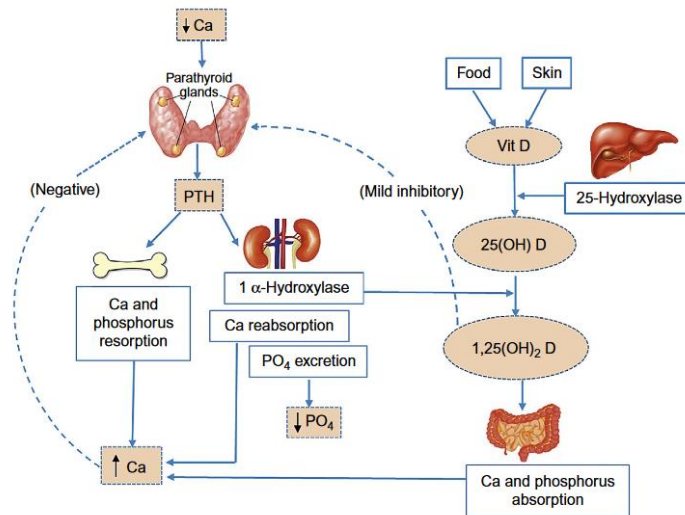


Figura 3- Esquema da Homeostasia do Cálcio(adaptado de (Song, 2017))

Sintetizando o esquema, a hormona PTH, é a mais influente no controlo da homeostasia do Ca. A diminuição do Ca do pool plasmático estimula a glândula paratiroide para a produção de PTH. Por sua vez a PTH vai atuar, diretamente a dois níveis. A nível ósseo, promovendo a reabsorção do Ca da matriz óssea e a nível renal, promovendo um maior aproveitamento do Ca proveniente da filtração renal.

Indiretamente, vai promover a formação e excreção da enzima 1-alfa hidroxilase, produzida ao nível renal. Esta vai permitir a formação da 1,25 D3 favorecendo o processo de hidroxilização. Posteriormente, o metabolito ativo da 1,25 D3 vai promover uma maior e mais eficiente absorção de Ca ao nível intestinal, aumentando as proteínas transportadoras de Ca nos locais de absorção, ao nível intestinal.

Com a manutenção dos níveis de normocalcémia, os mecanismos estão latentes, com a secreção de PTH a atingir um valor basal. Com a diminuição dos valores de calcémia, o mecanismo de feedback negativo é novamente anulado, desencadeando, novamente o processo.

4.2. Sinais clínicos de hipocalcémia

Quando os mecanismos homeostáticos das vacas não conseguem reverter a carência em Ca, os animais hipocalcémicos demonstram um quadro de sinais clínicos que têm tendência para se agravarem com o decorrer do tempo. Caso os valores de calcémia não sejam repostos o mais

imediatamente possível o prognóstico do animal torna-se reservado, sendo a instauração de tratamento considerada uma emergência.

Os sinais apresentados pelo animal são mais evidentes num caso de hipocalcemia clínica, pois, a sua forma subclínica pode passar despercebida aos olhos do produtor por não serem claros e, possivelmente, estarem associados a outras patologias.

À medida que o tempo passa e se concomitantemente permanecerem sem tratamento, começam a desenvolver, inicialmente, um quadro de hipersensibilidade, inquietação e excitabilidade (Divers & Peek, 2008) abanar constantemente as orelhas, passando posteriormente para uma fase em que não se conseguem manter de pé derivado da fraqueza muscular progressiva.

Os animais começam a apresentar sinais e sintomas de depressão e anorexia, pupilas dilatadas com pouco ou nenhum reflexo à luz e a cabeça virada para o flanco. A capacidade de regulação da temperatura corporal vai gradualmente reduzindo e a circulação periférica vai diminuir a sua atividade levando ao arrefecimento das extremidades (Divers & Peek, 2008). À medida que a hipocalcemia se vai desenvolvendo, a frequência cardíaca vai aumentando devido à diminuição do débito cardíaco resultante da redução do retorno venoso, e enfraquecimento do músculo cardíaco. Segue-se a fase comatosa com flacidez muscular associada, sendo o pulso quase indetetável apesar dos batimentos cardíacos rondarem os 120 batimentos por minuto (BPM). A morte pode ocorrer dentro de 12 horas do início dos sinais clínicos de hipocalcemia, devido à asfixia secundária que ocorre resultado do timpanismo ou devido a colapso cardiovascular (Divers & Peek, 2008).

A evolução da hipocalcemia clínica pode ser dividida em três estádios: (Rings, et al., 1997; Divers & Peek, 2008)

Estádio 1 – Vaca com capacidade de se levantar, no entanto apresenta desequilíbrio, excitação, tetania, hipersensibilidade e tremores musculares. Este estado é caracterizado pela apresentação de um comportamento letárgico. A vaca não apresenta uma temperatura febril. As extremidades (especialmente as orelhas) podem estar frias e as pupilas podem estar dilatadas.

Estádio 2 – caracterizado por um estado parésico, associado a depressão. Pode haver tremores musculares, ranger de dentes e incoordenação. A vaca pode ficar muito excitável e hiperestética. As extremidades estão frias, assim como a temperatura rectal abaixo do normal. Existe uma marcada diminuição da intensidade de contração cardíaca, diminuição dos sons e aumento da frequência (cerca de 80 BPM). O reflexo pupilar é incompleto ou ausente e o diâmetro pupilar está normal ou aumentado.

Estádio 3 – Vaca em decúbito lateral, com o pescoço com curvatura em S, em estado comatoso. As vacas afetadas não urinam nem defecam, e o reflexo anal é perdido. As pupilas estão dilatadas

e o focinho está seco. A temperatura está ainda mais baixa, os sons cardíacos quase inaudíveis com frequências elevadas (cerca de 120 BPM). Normalmente ocorre timpanismo ruminal com regurgitamento do seu conteúdo. Sem tratamento, alguns animais conseguem-se manter vivos durante algumas horas, mas o seu prognóstico é reservado e por fim conduz à morte por insuficiência respiratória como resultado do timpanismo ruminal que vai conseqüentemente comprimir o diafragma ou inalação do conteúdo ruminal. A progressão para o estágio final pode levar até 24 horas.

4.3. Fatores predisponentes à incidência de hipocalcémia

O surgimento de casos (clínicos ou subclínicos) de hipocalcémia podem ser causa de diversos fatores predisponentes à incidência da carência mineral.

Os fatores principais residem em causas metabólicas, na raça, idade e número de partos do animal e principalmente na dieta que é disponibilizada aos animais.

4.3.1. Fatores metabólicos

A alcalose metabólica predispõe as vacas para a incidência da hipocalcémia. O estado de alcalose metabólica inibe a resposta homeostática dos animais, à atuação da PTH. (Goff, 2008) defende que a conformação do recetor para a hormona PTH é alterado durante o estado de alcalose, contribuindo assim para tornar os tecidos menos sensíveis e responsivos a atividade hormonal. Falta de responsividade à PTH pelo tecido ósseo dificulta a utilização e re-captção eficaz do Ca ósseo, impedindo a ativação osteoclástica e aumento da reabsorção óssea. Também contribui para colocar em causa a resposta renal à ação hormonal, reduzindo a reabsorção de Ca a esse nível. Por consequência, a diminuição da resposta renal traduz-se na impotência dos rins para a conversão de 25-hidroxivitamina D em 1,25 D₃, colocando em causa o aumento da absorção de Ca proveniente da dieta ao nível intestinal (Goff, 2008).

Dentro dos fatores metabólicos, o estado de hipomagnesiémia contribui para uma maior incidência de hipocalcémia. Numa fase inicial, o deficit em magnésio leva a uma menor secreção hormonal por parte da paratiroide em resposta à deficiência em Ca. Secundariamente, contribui para a redução da sensibilidade dos tecidos para responder à atuação hormonal, reduzindo assim a resposta à PTH (Koch, 2013 citando Jesse P. Goff, 2008).

4.3.2. Raça

A raça tem influência no aparecimento e incidência da hipocalcémia na medida em que animais com maior aptidão leiteira que produzem um leite e colostro com maior concentração de Ca, são mais predispostos para um maior deficit e necessidade de Ca devido à sua libertação através da glândula mamária aquando do início da lactogénese. Animais da raça Vermelha Sueca e da raça Jersey estão mais predispostos para uma maior incidência, consequência da maior quantidade de

Ca no colostro e leite é aliado ao facto de uma menor quantidade de recetores intestinais para a 1,25 D3. (Horst et al., 2010) refere que animais da raça Jersey possuem uma menor quantidade de recetores intestinais para 1,25 D3, comparativamente com vacas Holstein com idade mais avançada. Menor quantidade de recetores traduz-se numa perda da sensibilidade nos tecidos-alvo.

4.3.3. Idade e número de partos

Diferentes autores defendem que animais múltiparos e consequentemente com uma idade mais avançada estão mais predispostos para a incidência de hipocalcémia. Inerente ao mecanismo de ação da idade na hipocalcémia está subentendido a diminuição/ deterioração da resposta à ação hormonal. Esta redução deve-se à diminuição, gradual, da capacidade de mobilização de Ca dos reservatórios (por exemplo, ósseo) fazendo face aos aumentos repentinos da necessidade de Ca aquando do início da lactação. Uma menor resposta dos mecanismos homeostáticos à ação hormonal aliada a uma menor quantidade de recetores hormonais nos locais de maior absorção, predispõem as vacas para uma menor capacidade de mobilização de Ca das suas reservas corporais em situações de stress mineral (Horst, et al., 2010). Concomitantemente, à medida que as vacas envelhecem, a produção de leite aumenta (especialmente até a quarta lactação), o que resulta numa maior necessidade e demanda por Ca (Horst et al., 2010).

4.3.4. Alimentação

O fator da alimentação, no mecanismo de ação da hipocalcémia está interligado com a influência dos fatores metabólicos. Animais num estado de alcalose metabólica apresentam menor responsividade à ação hormonal, que exercem o controlo sobre a homeostasia do Ca. A alimentação dos animais pode ser manipulada de diferentes pontos de vista de modo a facilitar a ação dos mecanismos homeostáticos do animal face aos deficits minerais.

Existem duas possibilidades, frequentemente utilizadas, de manipulação do arraçamento para combater o deficit de Ca. A primeira vertente passa pela diminuição da quantidade de Ca na formulação, em animais no período seco e no pré-parto, de modo a que os mecanismos homeostáticos controladores dos valores de calcémia fiquem previamente ativados, podendo reverter, de um modo mais imediato e prontamente, qualquer deficit de Ca que possa ocorrer, durante o período crítico.

Numa diferente vertente sucede a instauração de uma dieta aniónica.

O principio das dietas aniónicas reside na adição de um maior número de aniões à dieta face a quantidade de catiões presentes, que consequentemente, causa uma perturbação no estado ácido-base do animal, desequilibrando o balanço dietético catiões-aniões com o propósito de atingir um estado de acidez metabólica (Heinrichs, 1996). Uma diminuição no pH sanguíneo das vacas para um estado metabólico de acidez, leva à redução do pH do sangue e da urina. Esta diminuição

facilita a ação da PTH, aumentando a responsividade dos tecidos à ação hormonal. A adição de aniões à dieta aumenta concomitantemente os níveis osteoclásticos estimulando a reabsorção óssea (Horst et al., 2010).

5. Fósforo

O P, é um macro mineral essencial para a homeostasia dos sistemas vitais das vacas, possuindo inúmeros papéis na fisiologia dos bovinos leiteiros, onde está presente, maioritariamente, nos ossos e dentes, caracterizando-se como o segundo componente mais importante apenas atrás do Ca, proporcionando a estas estruturas e tecidos a rigidez e estabilidade características. A sua forma, biologicamente ativa é inorgânica, denominada de fosfato, com a fórmula química PO_4 , encontrando-se usualmente sob esta forma no animal (Song, 2017).

Ambos os minerais, Ca e P, são fornecidos aos animais através da dieta, onde a sua absorção é regulada em alto grau para Ca e, em menor grau, para P. A perda irreversível desses minerais, dos pools mais ativos do animal (extracelular e plasmático) ocorre, principalmente, através da perda fecal endógena, perda urinária, perdas direcionadas para o feto promovendo o crescimento muscular e ósseo e na produção de leite. Principalmente disponibilizado ao animal através da dieta, o balanço de P em ruminantes adultos é determinado, principalmente pela regulação da digestão de P, retenção de P no leite e regulação da permuta de P entre sangue e osso. Nestes, a reciclagem através da salivagem é um dos fatores mais preponderantes, que determina o balanço e equilíbrio entre a absorção e a excreção do P (Grünberg, 2014).

5.1. Papel do fósforo na fisiologia dos bovinos de leite

O P é componente essencial na integridade celular, na medida em que constitui uma parte integral dos fosfolípidos presentes e que formam as membranas celulares. O P integra a estrutura das fosfoproteínas, dos ácidos nucleicos como DNA e RNA e de moléculas de transferência de energia, como ATP. Constitui um componente essencial no sistema tampão ácido-base, funcionando como um tampão eficaz em fluídos biológicos, como citosol, urina ou líquido ruminal, contribuindo para a manutenção do equilíbrio ácido-base no organismo (Goff, 2006; Grünberg, 2014) .

No final da gestação, o P presente no pool sanguíneo, pode diminuir, precipitadamente, à medida que o crescimento do feto acelera e remove quantidades substanciais de P da circulação materna. No início da lactação, a produção de colostro e leite atrai grandes quantidades de P para fora dos reservatórios extracelulares. O conjunto de todos estes fatores resulta uma descida repentina nos níveis de P.

Assim, o controlo preciso da nutrição de P torna-se crucial numa fase pós parturiente, para otimizar o desempenho e saúde dos bovinos leiteiros, como tal a manutenção dos níveis de homeostasia do mineral passa pela conservação e reciclagem, através de reabsorção óssea, conservação ao

nível renal e particularmente para P, retorno ao intestino através da saliva (NRC, 2001; Reinhardt et al., 2011).

5.2. Fisiologia do fósforo

Durante o final da gestação, o desenvolvimento do esqueleto fetal retira cerca de 10g de P por dia, onde cerca de 0,3 g de P é incorporado em cada kg de tecido corporal (músculo) adquirido durante o crescimento do animal. Associado ao início e produção de leite, a glândula mamária contribui consideravelmente, para as perdas diárias de P. Com concentrações de P no leite a variarem entre 0,7 e 1,3 g / L as perdas diárias de P através da glândula mamária podem facilmente exceder 40g. Assim, a glândula mamária e a lactogénese constituem um desafio aos mecanismos reguladores da homeostasia do P (Klop et al., 2015). Como a eficiência da utilização de P pelos bovinos leiteiros é definida pela quantidade de P incorporada na produção do leite e focalizada para o crescimento do corpo em relação à quantidade de P ingerida fornecido pela dieta, qualquer variação na retenção de P no leite é um fator significativo na determinação da eficiência das vacas leiteiras de alto rendimento.

Com a concentração plasmática para os níveis normais de P a residir no intervalo de 4 a 8 mg/dl, a bibliografia defende que animais mais jovens e em desenvolvimento, como por exemplo novilhas primíparas, devem residir dentro do intervalo de 6 a 8 mg/ dl enquanto para animais adultos, o intervalo reside entre os 4 to 6 mg/dl. Esta diferenciação nos valores dos intervalos reside no facto que animais em crescimento possuem mais P em circulação, derivado da formação óssea e muscular (NRC,2001).

A maior parte do P fornecido aos bovinos provém da dieta disponibilizada, sendo absorvido principalmente ao nível do intestino delgado. O transporte passivo pode ocorrer quando a concentração de P na dieta dos animais é muito elevada, ocorrendo logo no início do intestino delgado. Em situações de baixa concentração de P, o transporte ativo é feito pelos co-transportadores de sódio (Na) e P, especialmente no jejuno e íleo. O P inorgânico é assim transportado através de todos os tipos de membranas celulares, por transporte ativo acoplado ao Na.

Esses co-transportadores vão mediar o transporte de P no trato gastrointestinal e a reabsorção de P inorgânico nos túbulos renais proximais (Klop et al., 2015).

A absorção de fosfato pode ocorrer em todas as secções do rúmen e no intestino delgado e grosso, mas a maior parte da absorção ocorre no duodeno e no jejuno dos ruminantes. A absorção de fosfato geralmente está diretamente relacionada ao suprimento de fosfato potencialmente absorvível no lúmen do intestino delgado.

Um dos papéis mais preponderantes na manutenção dos níveis normais de P no pool sanguíneo passa pela ação das glândulas salivares. O P endógeno excretado pelas glândulas salivares através da saliva, torna-se disponível no rúmen para utilização da flora microbiana ruminal pode, posteriormente, ser absorvido ao longo do trato gastrointestinal (Grünberg, 2014). Possibilitando aos

animais um controlo dos níveis excessivos de P no pool sanguíneo a maior parte deste P secretado é reabsorvido, posteriormente ao retorno ao intestino delgado por intermédio dos mecanismos de ruminação.

A homeostasia do P rege-se por princípios fisiológicos semelhantes à fisiologia do Ca. A carência deste mineral, comparativamente associada com a deficiência em Ca, vai estimular a ação e produção hormonal de PTH e 1,25 D3. Paralelamente à produção da CT na fisiologia do Ca, no P ocorre a produção de um grupo de substâncias designadas “fosfatoninas” com uma função preponderante e abrangente sobre toda a homeostasia do P.

Assim os mecanismos fisiológicos do P são mantidos, principalmente pela ação de 3 hormonas:

- Paratormona (PTH);
- 1,25-di-hidroxivitamina D3(1,25 D3);
- Fosfatoninas (FGF23).

5.2.1. Paratormona (PTH)

A PTH tem, novamente, um papel crucial na manutenção dos níveis da homeostasia mineral. Mantendo o controlo, de uma forma, não tão restrita sobre o P, esta hormona vai ser principalmente secretada durante períodos de stress, causado pelos níveis de Ca, exercendo uma ação secundária, mas preponderante sobre os níveis homeostáticos de P.

Focando a atenção no P, mas sem poder descurar a ação do Ca nesta equação, os níveis de hipocalcémia vão estimular a paratiroide para uma produção de PTH em maior grau, comparativamente aquando da carência em P. O deficit vai estimular a produção hormonal aumentando os níveis de PTH em circulação. Este aumento vai produzir um controlo sobre a homeostasia do P através de 2 ações: numa primeira fase a ação hormonal passa pelo aumento da excreção de P através da urina e saliva. Este aumento da eliminação do mineral pode parecer contraditório, numa fase onde se procura a manutenção e aumento dos níveis de P no pool sanguíneo e onde a excreção renal e salivar de P, pode ser prejudicial à manutenção de concentrações normais de P no sangue. No entanto, a excreção ao nível salivar constitui uma das ações mais preponderantes na manutenção da homeostasia dos mecanismos fisiológicos do P nas vacas e prevenção de casos de hiperfosfatémia. O aumento da segregação de PTH em resposta à diminuição da calcémia vai promover a mobilização de Ca do osso, liberta também grandes quantidades de P (Almeida, 2010). Para controlar a situação, a hormona vai estimular a excreção salivar de P, onde as glândulas salivares removem entre 30 a 90 g P do pool extracelular, diariamente. Assumindo uma produção salivar, diária, de aproximadamente 230 L em vacas lactantes adultas, a excreção salivar de P pode ser estimada entre 25 e 100 g de P por dia (Reinhardt et al., 1988; Goff, 2006). O P removido do reservatório extracelular previne que o animal desenvolva um caso de hiperfosfatémia. Porém,

vai ficar disponível para os bovinos o reaproveitarem, por intermédio do processo de ruminação. Através deste, as vacas conseguem voltar a captar o P, perdido do pool extracelular, devido ao retorno da matéria resultante da ruminação, conjugada com a saliva excretada, rica em P. Voltando a realizar a digestão sobre o material da ruminação, as vacas conseguem assim reaproveitar grande parte do P excretado pelas glândulas salivares, permitindo ao animal a re-captção do P no local de maior facilidade de transporte para o pool sanguíneo. A ação da PTH sobre este mecanismo homeostático fica completa com a promoção e aumento da excreção de P ao nível urinário e fecal. Favorecendo a eliminação do P, o excedente e o P que não é captado por intermédio do regresso da ingesta do processo de ruminação é libertado do animal pelas fezes e urina, assegurando a manutenção e controlo dos níveis de P, prevenindo um quadro de hiperfosfatémia. Numa outra vertente, a ação hormonal, vai desencadear a mobilização de P proveniente do osso, estimulando, paralelamente ao Ca, a ação osteoclástica e osteoblástica, visando o aumento da reabsorção óssea. Porém o P absorvido do reservatório ósseo, não contrariaria o que é excretado ao nível salivar, tendo esta ação um papel pouco preponderante na homeostasia dos animais (Grünberg, 2014).

A ação da PTH pode, numa vertente secundária e indireta, estimular o rim para produzir 1,25 D3, que eventualmente, pode aumentar a eficiência da absorção intestinal de fosfato corrigindo a hipofosfatémia. No entanto, deve ser lembrado que o PTH é secretado, maioritariamente, em resposta à hipocalcémia, não à hipofosfatémia (Grünberg, 2014).

5.2.2. 1,25-di-hidroxitamina D3 (1,25 D3)

O papel mais preponderante na homeostasia do P passa pela ação da 1,25 D3. Sob condições de hipofosfatémia, os níveis plasmáticos de 1,25 D3 vão subir, desencadeando uma ação direta na estimulação do transporte de fosfato intestinal e aumento ao nível sanguíneo (Reinhardt et al., 1988; Goff, 2006).

Exercendo duas funções relevantes sobre o controlo dos níveis de P, a 1,25 D3 promove a eficiência e aumento da absorção de P, principalmente ao nível intestinal e nos locais de maior captação do mineral.

O P é primariamente absorvido no intestino delgado por transporte ativo. Difundindo-se através do meio intracelular até à membrana basolateral das células do epitélio intestinal, principalmente por intermédio de um canal onde, acoplado à bomba Na / Potássio (K) ATPase, o seu transporte é facilitado, promovendo a passagem do P através da membrana para os fluídos extracelulares. A hormona 1,25 D3, através dos recetores da vitamina D, localizados ao nível dos locais de absorção vai promover a transcrição de proteínas co-transportadoras, que vão intermediar o transporte de fosfato acoplado ao Na (Jesse P. Goff, 2018). Estimulando a ação e eficiência desse mecanismo a 1,25 D3 promove, paralelamente à homeostasia do Ca, o aumento das proteínas transportadoras

nos locais de maior absorção. Contrariando o gradiente de concentração, o P vai se interligar ao Na e através dos co-transportadores, vão mediar e facilitar o transporte de P no trato gastrointestinal (Klop et al., 2015). A eficácia da absorção de P intestinal pode, em teoria, ser regulada durante os períodos de deficiência pois a produção renal de 1,25 D3 é diretamente estimulada por um nível de P muito reduzido.

Numa outra vertente, aumenta a reabsorção renal de P pelo aumento da atividade do transportador de Na/P ao nível renal. Diminuindo a excreção do mineral, vai permitir ao animal um maior aproveitamento do P disponível e uma maior e mais eficiente reabsorção de P inorgânico nos túbulos renais proximais (Goff, 2018).

Secundariamente, influencia a secreção de PTH através de um mecanismo de feedback negativo, onde os níveis de deficit mineral despoletam a ação hormonal e desencadeiam o mecanismo de ação da glândula paratiroide. Cessando a secreção da PTH previne a excreção de P pelos mecanismos de ação das glândulas salivares e a nível renal e fecal, favorecendo uma maior captação e manutenção dos níveis de normofosfatémia.

5.2.3. Fosfatoinas

Paralelamente à homeostasia do Ca, na homeostasia do P existe um grupo de substâncias que influenciam todo o mecanismo de controlo dos níveis de P. O aumento, ao nível sanguíneo, de fosfato vai levar os osteócitos e osteoblastos a secretar uma hormona peptídica denominada fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF23). Ao nível dos mecanismos homeostáticos do P, esta hormona peptídica vai desenrolar um papel, onde vai influenciar todas as hormonas “em jogo”. Prevenindo os níveis de hiperfosfatémia, vai promover a fosfatúria, modulando a reabsorção tubular e favorecendo a excreção de P a nível renal na procura dos níveis homeostáticos de fosfatémia.

Ao nível dos mecanismos de ação da 1,25 D3 vai diminuir a sua produção, inibindo todo o processo de síntese e formação da 1,25 D3 ao inibir a atividade da enzima 1 α -hidroxilase. Vai igualmente estimular a atividade da 24-hidroxilase, levando à inativação da 1,25 D3. Todas estas ações vão promover a diminuição da 1,25 D3 e indiretamente a absorção intestinal de fosfato, uma vez que esta é dependente de 1,25 D3 (Silver et al., 2012)

Ao nível da PTH, vai inibir a sua excreção através da repressão da transcrição do gene da PTH e da inibição da secreção da paratiroide. Inibindo a sua secreção, vai indiretamente, suspender os mecanismos de absorção de P promovidos pela hormona PTH.

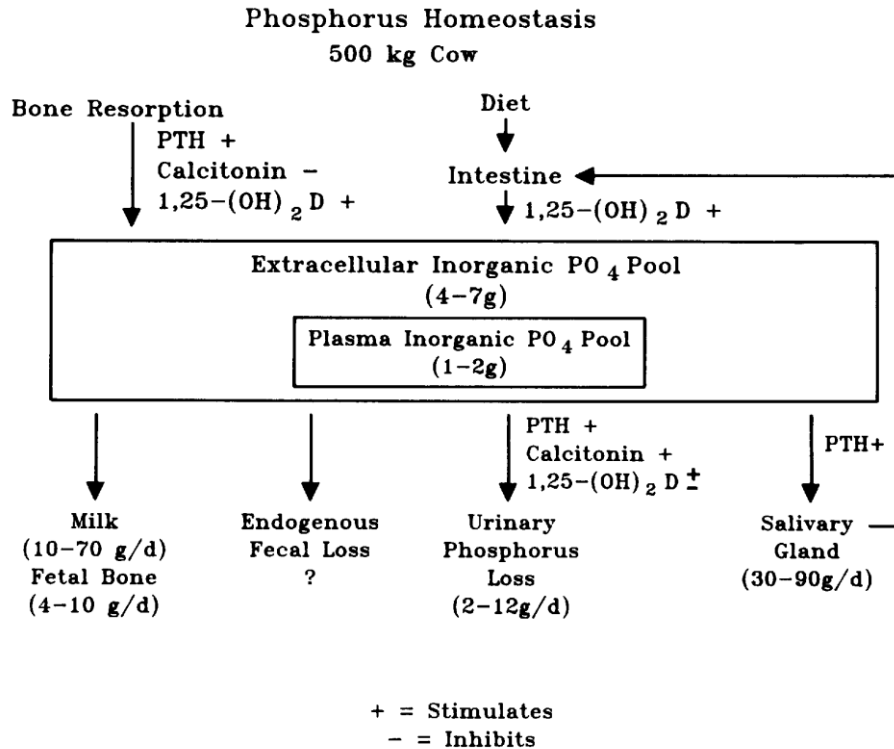


Figura 4- Esquemática da Homeostasia do Fósforo (adaptado de (T. A. Reinhardt et al., 1988))

5.3. Cálcio vs Fósforo

O Ca é o principal mineral nos mecanismos fisiológicos dos bovinos leiteiros. Estes procuram, através de um controlo rigoroso a manutenção dos níveis sanguíneos de normocalcémia com o principal objetivo de manutenção da homeostasia fisiológica do animal. No entanto, o mineral P possui um papel preponderante nas vacas leiteiras. O facto de entrar em diversos mecanismos interagindo em diferentes parâmetros fisiológicos traduz assim o seu peso na homeostasia dos animais. Assim estes procuram a regularização e manutenção dos seus níveis de forma rigorosa. Com a importância que ambos os minerais possuem na homeostasia dos bovinos leiteiros é extremamente difícil descurar a interligação entre o Ca e P no equilíbrio dos sistemas vitais dos animais. Regidos pelos mesmos mecanismos homeostáticos e ação hormonal a interligação entre ambos os minerais não pode assim ser descurada, principalmente aquando da altura de instauração e eleição do tratamento, caso este se justifique.

Devido à ligação entre ambos, pequenas oscilações dos níveis de Ca vão se traduzir em alterações nos níveis de P e vice-versa. Supõem-se que os níveis de Ca num bovino leiteiro, coincidentes com um caso de hipocalcémia, possam influenciar diretamente os níveis de P. Tal afirmação rege-se com o facto da ação dos mecanismos fisiológicos de ambos os minerais serem semelhantes e principalmente, serem controlados através da ação das mesmas hormonas. Uma das principais hormonas em ambos os mecanismos é a PTH. A sua ação sobre a fisiologia do P não é realizada

de uma maneira isolada. O mecanismo de ação desencadeado sobre a paratiroide é regido, concomitantemente associado ao nível de Ca presente no pool sanguíneo. Perante o nível de calcémia do animal em questão, a produção hormonal pode estar diminuída, ou manter-se até mesmo basal, consequência do mecanismo de feedback negativo, existente sobre a ação nos recetores que monitorizam os níveis de Ca e promovem os mecanismos de ação da glândula. Em casos de hipocalcémia, a secreção de PTH vai ser despoletada de uma forma mais acentuada e consequentemente aumentar os níveis hormonais em circulação, significativamente. Como consequência esse aumento hormonal, vai induzir 2 ações na fisiologia do P:

Por um lado, vai conduzir ao aumento da secreção de P, ao nível das glândulas salivares, libertando grandes quantidades de P, ao nível da saliva. A libertação do P ao nível salivar, permite ao animal o controlo do mesmo em ocasiões de hiperfosfatémia. No entanto, a quantidade de P, libertado através da saliva facilmente excede o P fornecido ao animal. Este aumento da secreção consequência do papel hormonal sobre a homeostasia do Ca pode levar a concentração de P para níveis coincidentes com um caso de hipofosfatémia.

No entanto, o aumento da excreção de P ao nível salivar permite aos ruminantes, suportados pelos mecanismos de ruminação, voltar a ingerir o P libertado do pool extracelular, permitindo a sua disponibilização e re-captção ao nível intestinal por intermédio do retorno do material resultante do processo de ruminação, juntamente com a secreção salivar.

Em vacas leiteiras, concentrações plasmáticas de P caem, rotineiramente, abaixo dos intervalos de referência aquando do parto e em vacas hipocalcémicas. O facto de a ação da PTH sobre o Ca privilegiar o maior aumento e absorção do Ca, no caso do P o facto de esta estimular a excreção ao nível renal e salivar, pode promover um estado de hipofosfatémia, associando à hipocalcémia inicial.

Devido ao controlo homeostático por intermédio das mesmas hormonas é defendido que aquando da segregação de PTH, em resposta à diminuição dos níveis de Ca, esta promove a mobilização de Ca do osso, levando a que exista, concomitantemente a libertação de grandes quantidades de P. Para evitar um caso de hiperfosfatémia, a PTH estimula, simultaneamente, a excreção do P através da saliva e a nível renal. Esta pode ser a razão por que animais com hipocalcémia estão também, geralmente num nível de hipofosfatémia (Blaine et al., 2015). Outro argumento defendido, passa pelo aumento da PTH em circulação promover posteriormente o aumento da excreção de fosfato, a forma inorgânica, a nível urinário, traduzindo assim num caso de hipocalcémia juntamente com hipofosfatémia.

Na vertente do P, a ação que uma dieta rica em P pode ter na homeostasia do Ca deve ser tida em conta. Uma dieta rica em P, pode resultar num aumento, ao nível do pool sanguíneo dos animais, de FGF23 com o propósito de controlar ou até reverter possíveis casos de hiperfosfatémia. Um

aumento da produção hormonal vai resultar na redução da produção de 1,25 D3. Esta redução pode ter consequências negativas na homeostase do Ca. Isso ajuda a explicar a inibição da absorção de Ca pela dieta que ocorre com dietas ricas em fosfato.

5.4. Papel do Fósforo num Caso de Hipocalcémia Clínica

Nos casos de hipocalcémia clínica, após diagnóstico, o tratamento de eleição passa pela administração de uma solução de Ca, por via endovenosa, de modo a reverter a carência mineral.

Por vezes, o animal mantém-se alerta e responsivo, porém não consegue-se levantar, apesar da administração da solução rica em Ca. Tal facto prende-se com a solução administrada por via parentérica não possuir, por vezes, na sua constituição o mineral P resultando na perpetuação do quadro de hipocalcémia clínica. O P, ao fazer parte/constituente das células e elemento essencial para o normal funcionamento das fibras musculares leva a que a não restauração dos valores normais para os níveis de P possa fazer com que o animal não consiga reverter o quadro clínico de hipocalcémia apenas com a suplementação de Ca, mantendo assim o decúbito esternal. O facto de o P fazer parte constituinte de moléculas de transporte de energia como ATP pode contribuir, igualmente, para a dificuldade e para o esgotamento das reservas energéticas do animal agravando o estado letárgico do animal.

O tratamento mais preconizado passa por uma abordagem clínica, onde após o diagnóstico do caso clínico e posterior suplementação endovenosa de Ca, opta-se pela suplementação de P através da administração de uma solução injetável da forma inorgânica de P, associada a vitamina B12 com o intuito de estimulação/suplementação dos processos metabólicos, principalmente a nível hepático. A patologia geralmente é complicada pela incidência concomitante de hipocalcémia, hipomagnesiémia, hipofosfatémia e, em alguns casos, hipoglicémia (Grünberg, 2014).

Concentrações plasmáticas de P, geralmente aumentam rapidamente após o tratamento do caso clínico hipocalcémia com soluções de Ca intravenoso. Esta rápida recuperação deve-se à redução da secreção de PTH, que reduz o risco e perda salivar de P. A administração de Ca, geralmente também provoca o reinício e estimulação da motilidade gastrointestinal, que permite a absorção de P dietético e reabsorção de secreções de saliva P.

6. Hipocalcémia Subclínica

O facto da incidência da hipocalcémia clínica se traduzir numa percentagem baixa, não significa que o animal não pode apresentar níveis abaixo dos intervalos definidos de referência. Tal facto prende-se com a incidência de casos de hipocalcémia subclínica. Esta consiste na diminuição dos valores de Ca sérico a níveis inferiores ao intervalo de referência sem apresentar os sinais e sintomas clínicos normalmente apresentados num quadro clínico de hipocalcémia (Caixeta et al., 2017). Na forma subclínica, é notório uma diminuição da função da musculatura lisa, podendo

posteriormente associar a sinais clínicos ou patologias que possam advir futuramente. Considerada uma porta de entrada para diferentes patologias a nível reprodutivo e produtivo a ocorrência de deslocamento de abomaso à esquerda (DAE) (3,7), cetose (5,5), retenção placentária (3,4) e metrite (4,3) vezes mais provável em vacas com hipocalcemia subclínica do que em vacas com níveis de normocalcemia (Rodríguez et al., 2017). Vacas normocalcêmicas, independente do número de partos, foram mais propensas a mostrar o primeiro estro mais cedo após o parto do que vacas com hipocalcemia subclínica (Mann et al., 2019).

Diferentes referências bibliográficas sugerem diversos valores ou intervalos para os quais as vacas, que estão inseridas nestes, apresentem ou não, um caso de hipocalcemia subclínica.

Tabela 12- intervalos de referência para casos de hipocalcemia subclínica para diferentes autores

| Autores | Intervalos de Referência para Casos de Hipocalcemia Subclínica |
|--|---|
| (Goff, 2008) | Concentração de Ca total no pool sanguíneo apresenta-se $\leq 2,0$ mmol / L ou $\leq 8,0$ mg / dl; |
| (Chamberlin et al., 2013) citando (Reinhardt et al., 2011) | Valores de Ca entre 1.38 e 2.0 mmol/L (5.5 a 8.0 mg/dl); |
| (Neves et al., 2017) | Concentrações plasmáticas de Ca no período pós-parto de ≤ 2.1 mmol/L ou ≤ 8.4 mg/dl; |
| (Venjakob et al., 2017) | Vacas que não apresentem sinais clínicos, mas com uma concentração de Ca sérico < que 2.0 mmol/L (8 mg/dl); |
| (Rodríguez et al., 2017) | Concentração de Ca total ≤ 2.14 mmol/L (8,5 mg/dl) |

Diversos autores reportaram que vacas leiteiras experimentam hipocalcemia subclínica quando a concentração de Ca total é < 8,0 mg/dl e hipocalcemia clínica quando os níveis séricos de Ca são < 6,0 mg/dl (Goff, 2008). Este mesmo autor reportou no seu estudo, respeitando o intervalo de 1,38 e 2,0 mmol / L (5,5 e 8,0 mg / dl) que entre 10 a 50 % das vacas leiteiras parturientes sofreram de hipocalcemia subclínica, Porém, outros estudos defendem a aplicação de diferentes intervalos para determinar a severidade do caso de hipocalcemia. Por exemplo, (Chamberlin et al., 2013), definiram que uma vaca normocalcemia teria níveis séricos de Ca > 2,20 mmol/L (8,82 mg/dl) , (Goff, 2008) alargou o critério a um intervalo de 2,12 a 2,50 mmol/L (8,5 a 10 mg/dl) para vacas normocalcêmicas e (Martinez et al., 2012) propuseram > 2,14 mmol/L (8,58 mg/dl) como valor limite para o qual o animal apresenta níveis de normocalcemia. Apesar da elevada percentagem de incidência, os casos subclínicos de hipocalcemia passam, a grande maioria das vezes, sem que os animais sofram qualquer tratamento direcionado para a carência mineral. Por se tratar da forma

subclínica, juntamente com o facto de estarmos a contactar com animais de grande porte e de produção, o diagnóstico laboratorial e os recursos imediatos escasseiam, o que torna complicado a atuação do veterinário e conduz a que os casos a passem sem que seja feito um diagnóstico definitivo e por vezes sem a instauração de terapêutica, colocando em causa o futuro produtivo e reprodutivo das vacas.

6.1. Consequências da hipocalcémia subclínica

Por se tratar de uma porta de entrada, a incidência da hipocalcémia subclínica predispõe os animais para o surgimento de patologias, com principal destaque para o foro reprodutivo.

O quadro de hipocalcémia pode conduzir à redução da motilidade ruminal e abomasal aumentando o risco de incidência de deslocamentos de abomaso. Predispõem igualmente para a redução ou supressão das contrações do músculo liso, levando não só a partos distócicos como posteriormente à diminuição da contração do músculo responsável pelo encerramento do teto após a ordenha, conduzindo assim à incidência de mastites. Predispõem também para a ocorrência de retenções placentárias e metrites devido a maior dificuldade de expulsão da placenta e lóquios. (Goff & Horst, 1997). Diversas fontes bibliográficas defendem que sobretudo a hipocalcémia subclínica foi relacionada à gravidade do corrimento vaginal no pós-parto devido à maior dificuldade de expulsão dos lóquios, à má involução uterina, à metrite e à disfunção ovariana (Grünberg, 2014; Blaine et al., 2015;). Tudo isto, aliado ao facto dos animais com valores de Ca coincidentes com um caso de hipocalcémia subclínica, apresentarem concentrações plasmáticas de cortisol aumentadas, associado à redução da ação dos neutrófilos com capacidade de fagocitose e concentrações reduzidas de Ca citosólico em células mononucleares, predispõem os animais para um estado de imunossupressão (Goff & Horst, 1997). Estas reduções nos mecanismos do sistema imune celular correlaciona a incidência de hipocalcémia com o surgimento de metrites, mastites e retenções placentárias (Martinez et al., 2012).

6.1.1. Influência do cálcio nos deslocamentos de abomaso

A incidência de deslocamentos de abomaso é mais significativa nos períodos pós-parto, onde o espaço criado pela presença e posterior saída do vitelo associado ao balanço energético negativo que os animais experienciam neste período, crítico, faz com que um maior número de casos ocorra nas proximidades do período pós-parturição.

A diminuição da quantidade de Ca e P faz com que os mecanismos de contração da musculatura lisa dos órgãos como rúmen e abomaso estejam diminuídos ou mesmo ausentes. (Kincaid, 2008) defende que animais com valores de Ca inferiores a 8 mg/ dl demonstraram uma diminuição das contrações ruminais, aliada a uma menor magnitude dos movimentos ruminais. Assim, devido à inércia e atonia muscular, a matéria ingerida não sofrerá a devida digestão, bem como ocorrerá uma acumulação de resíduos entre os quais gás proveniente da fermentação sofrida pelas matérias

ingeridas pelas vacas. Este gás vai distender o abomaso e predispor ao seu deslocamento. Somado, posteriormente, à diminuição da ingestão da matéria seca, traduz-se na ausência da barreira física que o rúmen oferece à movimentação do abomaso. Aliando tudo isso à ausência de tonicidade abomasal, constituem os elementos mais importantes na patogênese do deslocamento do abomaso à esquerda (Shaver, 1997).

O facto de o animal experienciar o balanço energético negativo, no período pós-parto, consequência da menor quantidade de ingestão de matéria seca neste período, faz com que a carência de nutrientes e minerais esteja inerente. A deficiência de ingestão de minerais como Ca e o facto de os mecanismos de compensação não conseguirem reverter a situação, juntamente com a diminuição da absorção intestinal faz com que esta carência se torne num ciclo vicioso e seja associada a impactos em termos reprodutivos e produtivos nos animais e na saúde económica da exploração.

6.1.2. Influência do cálcio nas mastites

A diminuição da quantidade de Ca leva a que haja uma diminuição dos mecanismos de contrações ao nível muscular. Após o fim da ordenha é essencial que ocorra a contração do músculo esfíncter do teto responsável pelo encerramento do teto evitando assim a possibilidade de entrada ou conspurcação do canal do mesmo. Caso os mecanismos de contração muscular estejam diminuídos, consequência da menor concentração de Ca no pool sanguíneo, sujeita os animais a um maior risco, levando o(s) animais em questão a estarem mais suscetíveis a uma maior predisposição para a ocorrência de mastites.

Outro fator que potencia uma maior predisposição para o surgimento de mastites, prende-se com o facto dos animais, após o parto, experienciarem algum grau de imunossupressão devido ao período crítico em torno do momento de parição. Somando o fator hipocalcémia, que vai potenciar a situação e a diminuição da contração da musculatura faz com que a incidência de mastites seja mais relevante em vacas com deficit de Ca. Num estudo de Martinez et al. (2012), ficou demonstrado que o número de neutrófilos está reduzido e a sua capacidade de sofrer fagocitose e ação oxidativa foi prejudicada em vacas afetadas por hipocalcémia, o que pode em parte explicar o aumento do risco de doenças infecciosas. A nível celular, a função das células imunes foi suprimida, resultado da redução da concentração de Ca citosólico (Martinez et al., 2012). Tal facto demonstrou que os animais hipocalcémicos estão mais predisponentes para a incidência de patologias como mastites.

6.1.3. Influência do cálcio nas retenções placentárias e metrites

A ocorrência da carência mineral faz com que exista a diminuição das contrações musculares. Tal facto exerce um efeito direto na gênese da retenção placentária pois justifica uma maior dificuldade de expulsão dos restos provenientes do parto. A diminuição de contractilidade da

musculatura lisa faz com que a atonia muscular, ao nível uterino, influencie a involução pós-parturição, resultando num aumento da incidência de retenções placentárias devido à maior dificuldade de expulsão dos restos provenientes do parto. Devido à ocorrência de retenções placentárias os animais estão mais suscetíveis à ocorrência de metrites pois a dificuldade de eliminação da placenta e posterior eliminação dos lóquios predispõem as vacas para o aparecimento de metrites. Associada à inércia muscular, os animais apresentam as suas funções imunes prejudicadas, exacerbada pela incidência de hipocalcémia, consequência de uma redução dos níveis intracelulares de Ca nas células polimorfonucleares, favorecendo um declínio na atividade fagocítica dos neutrófilos (Rodríguez et al., 2017).

As vacas que desenvolvem hipocalcémia têm 3 a 4,2 vezes maior probabilidade de desenvolver retenção placentária do que vacas normocalcémicas (Rodríguez et al., 2017). Indiretamente, a hipocalcémia subclínica também predispõem os animais para a incidência de retenções placentárias e metrites, na medida em que o deficit mineral, na altura do parto pode se reproduzir através de um parto distócico e posteriormente associar-se às patologias do foro reprodutivo.

7. Objetivos

Com tudo isto os objetivos deste trabalho são:

- Estudar a real incidência de hipocalcémia subclínica nas explorações;
- Compreender os factores de risco de hipocalcémia subclínica nestas explorações;
- Compreender os factores associados com a baixa percentagem de incidência de casos de hipocalcémia clínica nas explorações;
- Avaliar a relação entre hipocalcémia subclínica e afeções do puerpério nos animais das explorações;
- Discutir a relação entre a incidência de hipofosfatémia e a correlação com hipocalcémia;
- Refletir sobre um conjunto de recomendações para melhoria do manejo, bem-estar e níveis produtivos destes animais

8. Material e Métodos

8.1. Caracterização das explorações

O estudo, de carácter transversal, foi realizado abrangendo os bovinos de aptidão leiteira provenientes de vacarias localizadas na zona periférica do concelho de Loures. Para maior facilidade de apresentação dos resultados e diferenciação das vacarias, estas foram categorizadas em vacaria A (VacA) constituída por 230 e vacaria B (Vac B) com 146 animais adultos em idade reprodutiva.

Em ambas as explorações os animais estão distribuídos por diferentes parques, consoante a altura prevista de parto, o período de lactação, a idade e o período de gestação. Nas duas vacarias são realizadas duas ordenhas diárias, separadas por cerca de doze horas em salas de ordenha semelhantes, apenas diferenciadas no número de pontos. Os animais residentes são sujeitos a processo de inseminação artificial num programa reprodutivo de cross-breeding com utilização de 3 raças de animais. A alimentação é realizada consoante o parque em questão, sendo uniforme dentro de cada um. Em ambas as explorações é realizado um controlo e seguimento do ciclo gestacional dos animais, através de palpação retal para confirmação de gestação aos 36, 80 e 150 dias de gestação, aproximadamente. A cerca de 60 dias do término da gestação, variando de animal para animal, é realizado o processo de secagem. Estes animais são separados para um parque, onde a alimentação é própria para o período seco. Entre os 250 a 260 dias de gestação, sensivelmente, os animais são separados dos restantes para a zona designada de pré-parto que irá funcionar como maternidade da exploração, onde permanecem até ao momento do parto.

O manejo dos animais é realizado de modo semelhante nas duas vacarias, apenas diferenciando o número do efetivo e o tipo de alimentação entre as mesmas.

8.1.1. Alimentação

A alimentação foi um fator de destaque durante a realização do ensaio clínico. Por se tratar dos fatores mais preponderantes e influenciadores no resultado deste teste, foi pedido o auxílio ao nutricionista das vacarias, de modo a disponibilizar a formulação da alimentação dos animais, no período/parque dos animais secos, onde é mais relevante para os resultados obtidos. Disponibilizada a formulação da dieta que é dispensada aos animais, foi possível constatar que:

- ✓ **Na vac. A**, cada animal estava a consumir 8,5 kg de matéria seca no período seco. Cada kg de matéria seca continha 6,1 g de Ca e 3,8 g de P. Resulta na ingestão de cerca de 49,59 g de Ca e 32,5 g de P.
- ✓ **Na vac. B**, cada animal estava a ingerir 11,31 kg de matéria seca que continha 6,5 g de Ca por cada kg de matéria seca e 3,6 g de P por cada Kg de matéria seca ingerido. No

total, na vac. B, os animais, no período seco, estavam a consumir 73,52 g de Ca e 40,71 g de P.

No período do pré parto, o Ca e P disponibilizado é proveniente das matérias primas presentes na formulação.

8.2. Desenho experimental

O presente estudo foi realizado entre os meses de Novembro (10/11/2018) a Janeiro, (10/01/2019). O estudo abrangeu os animais distribuídos pelas instalações de 2 vacarias.

- ✓ Vac A é constituída por 230 animais lactantes;
- ✓ Vac B com 146 animais lactantes.

No decorrer do espaço temporal do estudo foram recolhidas aleatoriamente 100 amostras, do efetivo total de 376 animais adultos em idade reprodutiva.

Para a realização do estudo, foi feita a recolha de amostras sanguíneas mediante punção da veia coccígea dos animais após ocorrência do parto, para posterior medição dos níveis sanguíneos de Ca total e P inorgânico.

As amostras foram conservadas e posteriormente enviadas para o laboratório para análise dos níveis de Ca total e P.

8.2.1. Avaliação clínica

Para a caracterização e avaliação da incidência das patologias, do foro reprodutivo e produtivo que os animais possam sofrer, foram analisadas 4 doenças:

- ✓ Metrite;
- ✓ Deslocamento de abomaso à esquerda;
- ✓ Mastite clínica;
- ✓ Retenção placentária.

Para avaliação de incidência de metrite realizaram-se palpações retais num período compreendido entre cerca dos 5 dias até aproximadamente 30 dias pós-parto, sendo diagnosticado a presença de metrite consoante a examinação do útero, cor e cheiro do corrimento vaginal. Animais com o útero distendido, que apresentem um aumento anormal, com corrimento uterino vermelho-acastanhado, fétido e aquoso foram considerados positivamente para a incidência de metrite.

Ao nível do diagnóstico da presença de DAE, confirmou-se a existência de DAE através de auscultação com percussão do flanco esquerdo. Vacas que à auscultação da percussão do flanco seja perceptível a audição do som “ping” metálico característico foram consideradas como tendo DAE.

No caso da instauração de um quadro de mastite clínica, o diagnóstico foi feito através da avaliação de uma amostra de leite do animal pela existência de grumos, avaliação da cor e consistência do mesmo. Avaliou-se também a consistência do úbere e a sua temperatura, bem como a do animal. Animais que na amostra apresentem uma cor diferente do normal aspeto do leite, com grumos e consistência do úbere dura e quente ao toque, foram considerados como tendo mastite.

A definição utilizada neste ensaio para diagnosticar a presença de retenção placentária foi a permanência de parte ou da totalidade dos anexos fetais permanecem no lúmen uterino por um período de tempo superior a 12 horas após o parto fetal (Eduardo & Horta, 2000; Sheldon, et al., 2006).

8.2.2. Critérios de Inclusão

Os critérios de inclusão para este estudo foram os seguintes:

- Qualquer animal, primíparo ou múltiparo que tivesse concluído o tempo gestacional;
- Qualquer animal onde foi possível realizar a recolha da amostra sanguínea, dentro de um período temporal após o parto de 48 horas, caso preenchesse o 1º ponto;
- Animais que após o parto desenvolveram hipocalcémia clínica, mas aos quais ainda não tivesse sido implementado qualquer terapêutica;
- Qualquer animal que preenchesse o 1º ponto, independentemente de ter sido um parto singular, gemelar, um nado(s) morto.

8.2.3. Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão para este estudo foram:

- Qualquer animal, primíparo ou múltiparo, que não concluiu o período gestacional ocorrendo o aborto após os 150 dias de gestação;
- Qualquer animal que após o parto desenvolveu hipocalcémia clínica e ao qual foi implementado tratamento visando reverter a situação;

- Animais aos quais não foi possível a recolha da amostra sanguínea dentro de um período de 48 horas pós-parto;
- Animais cujo as amostras de soro que apresentaram elevado grau de hemólise.

8.3. Metodologia

As recolhas das amostras sanguíneas foram feitas após o parto, no máximo até 48 horas do mesmo, mediante venipuntura dos vasos coccígeos na região da cauda com agulha descartável de 18G acoplada a tubos coletores simples a vácuo sem aditivos (Figura 5).



Figura 5- Tubos Colectores Simples a Vácuo sem Aditivos com Agulha de 18 G após Recolha da Amostra Sanguínea (original do autor)

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas, o mais imediato possível, a 3000 rpm durante 10 minutos para separação e obtenção do soro sanguíneo. As amostras foram, após separação do soro sanguíneo do sangue total, colocadas para tubos eppendorf e conservadas a uma temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até ao momento da análise.

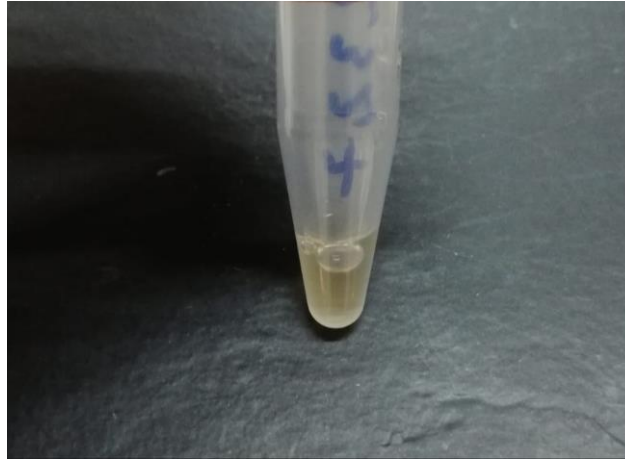


Figura 6- Amostra de Soro Sanguíneo após Centrifugação e Separação do Sangue Total (original do autor)

Em âmbito laboratorial, as amostras foram colocadas a descongelar à temperatura ambiente durante, sensivelmente 2 horas. Após descongelação, foi retirado cerca de 0,1 ml de soro dos tubos eppendorf e colocado num novo tubo dentro da analisadora juntamente com as tiras reativas e uma ponta de pipeta descartável (Figura 7). Durante 12 minutos as amostras são analisadas, individualmente para obtenção dos valores de Ca e P inorgânico. As amostras foram analisadas através da utilização dos kits da *SPOTCHEM II* para leitura dos níveis de Ca e P inorgânico (Figura 8).

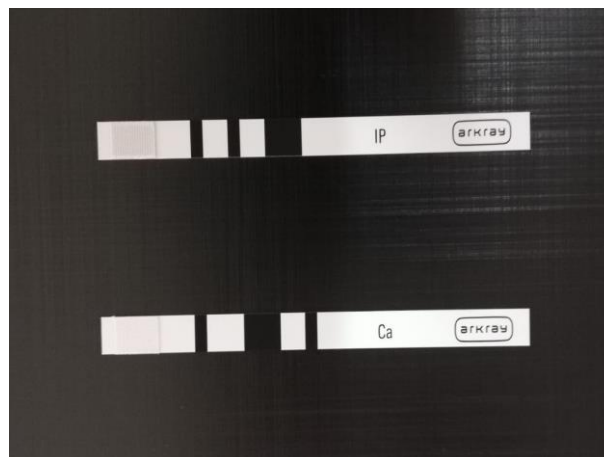


Figura 7- Tiras Reativas para Quantificação do Fósforo Inorgânico e Cálcio, respetivamente (original do autor)



Figura 8- Analisadora SPOTCHEM EZ com as Tiras Reativas para Posterior Análise (original do autor)

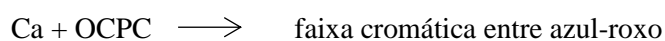
8.3.1. Metodologia para determinação dos níveis de cálcio

Os kits utilizados no ensaio clínico para a medição dos níveis de Ca total foram os da marca SPOTCHEM II. Primeiramente foi realizada a calibração da Analisadora *SPOTCHEM EZ*, seguindo o protocolo de calibração de cada embalagem de kits (Figura 9).

Os kits *SPOTCHEM II* possuem 25 tiras impregnadas com o reagente o-Cresolftaleina complexona (OCPC). Este reagente permite a determinação quantitativa dos valores de Ca ao nível do soro ou plasma sanguíneo.

As tiras são compostas por um campo de teste constituído por multicamadas impregnadas do reagente que permitem gerar uma alteração de cor. Após colocação da amostra de soro na Analisadora *SPOTCHEM EZ*, o Ca presente na amostra vai reagir com o OCPC num meio básico, originando uma alteração de cor na tira entre no espectro dentro da faixa de cores do azul a roxo, que será posteriormente medida a 575nm.

A equação resume a reação:



Será seguidamente, quantificada a quantidade de Ca por espectrofotometria de refletância, através da mudança de cor da tira.

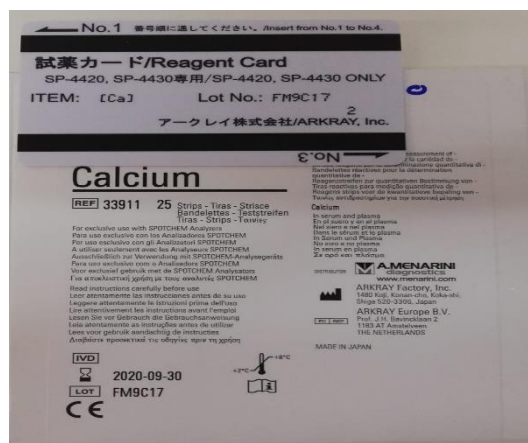


Figura 9- Kit para Medição do Cálcio Total com Cartão para Realização do Protocolo de Calibração (original do autor)

8.3.2. Metodologia para determinação dos níveis de fósforo inorgânico

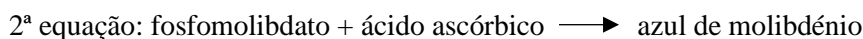
Os kits utilizados no ensaio clínico para medição dos níveis de P inorgânico foram os kits da marca SPOTCHEM II. Numa primeira fase foi realizada a calibração da analisadora, respeitando o protocolo da marca (Figura 10).

Após calibração, foi retirada uma amostra do soro obtido, onde após colocação na analisadora permitiu o contacto com a porção da tira, dividida em multicamadas, impregnadas em ácido ascórbico e molibdato de amónio tetra hidratado. O princípio deste teste reside em duas equações químicas, onde o resultado final vai geral uma cor que, posteriormente, vai ser quantificada através de espectrofotometria de refletância.

Numa primeira fase da reação química o P inorgânico vai reagir com o molibdato obtendo se como resultado da equação um complexo de fosfomolibdato.

Numa segunda reação química, o fosfomolibdato perante um meio com um pH ácido, resultado da presença do ácido ascórbico, o complexo formado é reduzido a azul de molibdénio. Posteriormente o resultado da segunda equação química vai ser avaliado, através do método de espectrofotometria de reflexão, medido a um comprimento de onda de 610nm o resultado da reação (Matheus, 2014).

As equações químicas esquematicamente apresentadas:



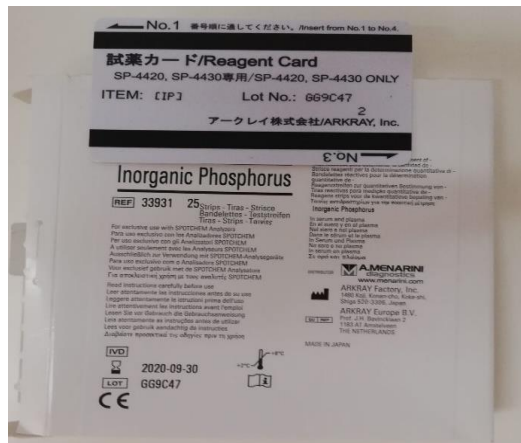


Figura 10- Kit para Medição do Fósforo Inorgânico com Cartão para Realização do Protocolo de Calibração (original do autor)

9. Análise estatística

A análise estatística deste estudo foi inteiramente realizada com recurso ao programa de *Excel 2016*. Os resultados apresentados são diferenciados entre os animais da vac. A e vac. B.

Todos os testes estatísticos executados durante a análise foram realizados com p value ($\alpha = 0,05$) por se tratar do valor de α mais utilizado em testes estatísticos e que permite um nível de confiança elevado, considerando um nível de significância de 5%. Numa fase inicial, foi feita a estatística descritiva das variáveis em estudo, incidindo primeiramente, sobre a análise dos valores de Ca. A estatística descritiva realizada na fase inicial do estudo foi feita com o propósito de possibilitar a avaliação da distribuição dos valores das variáveis em estudo, para determinar quais os testes estatísticos mais corretos para analisar/avaliar as variáveis. A primeira variável sobre a qual foi feita a estatística descritiva incidiu sobre os valores de Ca entre as duas vacarias.

Tabela 13- Estatística Descritiva dos Valores de Cálcio das duas Vacarias

| Valores Cálcio | Vac.A |
|----------------------|-------------|
| Média | 7,83 |
| Erro padrão | 0,286916456 |
| Mediana | 7,75 |
| Modo | 7,3 |
| Desvio padrão | 1,283129398 |
| Variância da amostra | 1,646421053 |
| Curtose | 0,316539938 |
| Assimetria | 0,623116946 |
| Intervalo | 5,1 |
| Mínimo | 5,6 |
| Máximo | 10,7 |
| Soma | 156,6 |
| Contagem | 20 |

| Valores de Cálcio | Vac.B |
|----------------------|--------------|
| Média | 7,67 |
| Erro padrão | 0,155152872 |
| Mediana | 7,4 |
| Modo | 7,4 |
| Desvio padrão | 0,84980728 |
| Variância da amostra | 0,722172414 |
| Curtose | -0,173586934 |
| Assimetria | 0,504886729 |
| Intervalo | 3,2 |
| Mínimo | 6,2 |
| Máximo | 9,4 |
| Soma | 230,1 |
| Contagem | 30 |

Da estatística descritiva sobre a variável em estudo, foi possível aferir o valor do coeficiente de curtose e a assimetria das amostras. O valor destes parâmetros possibilita constatar se a(s) variáveis estão bem modeladas e se seguem ou não uma distribuição normal, caso os valores de curtose e assimetria sejam próximos de 0.

A observação dos valores de curtose e assimetria permitiram constatar que a variável do Ca na vac. A (0,32 e 0,62 respetivamente) e B (-0,172 e 0,504 respetivamente) são uma variável com valores bem modulados, podendo ser caracterizada e tratada como uma distribuição normal. Por se tratar de uma distribuição caracterizada como normal foram conduzidos testes não-

paramétricos de normalidade para confirmar e concluir a estatística descritiva sobre a amostra e realizar a análise estatística do estudo.

A eleição dos testes analíticos recaiu sobre diversos fatores, justificados posteriormente.

9.1.1. Teste de Shapiro-Wilkks

O teste de Shapiro-Wilkks consiste num teste de normalidade, para variáveis que seguem uma distribuição normal. A sua eleição recaiu pelo elevado poder analítico do teste em variáveis de distribuição normal e pela sua viabilidade em amostras de tamanho diminuto ($n \leq 30$). Para amostras de dimensões mais reduzidas, entre 4 a 30 elementos, a utilização do teste traduz-se numa maior especificidade e robustez analítica da amostra. A utilização deste teste possibilitou a aferição dos intervalos de confiança nos quais os valores de Ca de ambas as vacarias estariam inseridas.

9.1.2. Teste de Qui-quadrado para intervalo de hipocalcémia de 5,5 – 8 mg/dl e intervalo de 5,5 – 8,5 mg/dl

O teste de qui-quadrado foi utilizado com o intuito de realizar a comparação entre variáveis quantitativas versus variáveis qualitativas. Como tal foi utilizado para avaliar a significância entre a ocorrência de hipocalcémia subclínica e a associação com aparecimento de patologias.

9.1.3. Teste T de formulação de hipóteses

Numa primeira fase realizou-se um teste T para avaliação e comparação dos valores de Ca das 2 vacarias. O princípio do teste T passa pela formulação de hipóteses de modo a confirmar ou desmentir as hipóteses formuladas.

Primeiramente é formalizada a hipótese nula (H_0) que, dependendo do valor de α seja maior ou não ao definido no início da análise estatística, esta é rejeitada ou aceite.

Numa segunda fase realizou-se o teste T para comparação dos valores de Ca e valores de P de ambas as explorações.

10. Resultados

Os resultados obtidos são apresentados diferenciando cada uma das vacarias (Vac. A e Vac.B).

Dos 100 animais previstos para entrarem em trabalho de parto, durante o tempo decorrente do estudo, 50 foram excluídos devido ao não cumprimento dos critérios de inclusão.

O universo da amostra foi assim composto por 20 animais provenientes da Vac. A e 30 animais da Vac. B.

Considerou-se numa primeira fase, respeitando o valor mais citado bibliograficamente, que uma vaca apresentava hipocalcemia subclínica quando os valores sanguíneos de Ca total, se encontravam entre 5,5 e 8 mg/dl. Apenas valores superiores a 8 mg/dl foram considerados dentro do intervalo para normocalcemia.

Numa fase seguinte, foram feitas as extrapolações, considerando um intervalo para a hipocalcemia subclínica de 5,5 a 8,5 mg/dl.

Considerou-se que um animal apresentava níveis de hipofosfatemia respeitando os intervalos de referência aplicáveis consoante a idade e o número de parto(s) do animal. Assim, para novilhas primíparas, os valores devem residir dentro do intervalo de 6 a 8 mg/dl enquanto que para animais adultos, o intervalo reside entre os 4 a 6 mg/dl.

A incidência das patologias analisadas, para fatores de tratamento estatístico, foi definida como uma variável binominal (presente/ausente onde o número 0 correspondia ao ausente enquanto o número 1 correspondia ao presente) consoante a avaliação do veterinário e implementação de tratamento.

10.1. Valores de calcemia na Vacaria A

O intervalo de confiança onde reside maior probabilidade de encontrar os valores de Ca dos animais da vac. A foi composto pelo intervalo de valores entre 7,229 a 8,431 mg/dl. Os valores médios de Ca obtidos nos animais foram de 7,83 mg/dl +/- 1.28 mg/dl.

Ao analisar os níveis de Ca, foi possível constatar que, dos 20 animais, 13 deles (65%) apresentavam níveis coincidentes com o intervalo de referência para hipocalcemia subclínica enquanto 7 deles (35%) apresentavam níveis acima de 8 mg/dl (Gráfico 3).

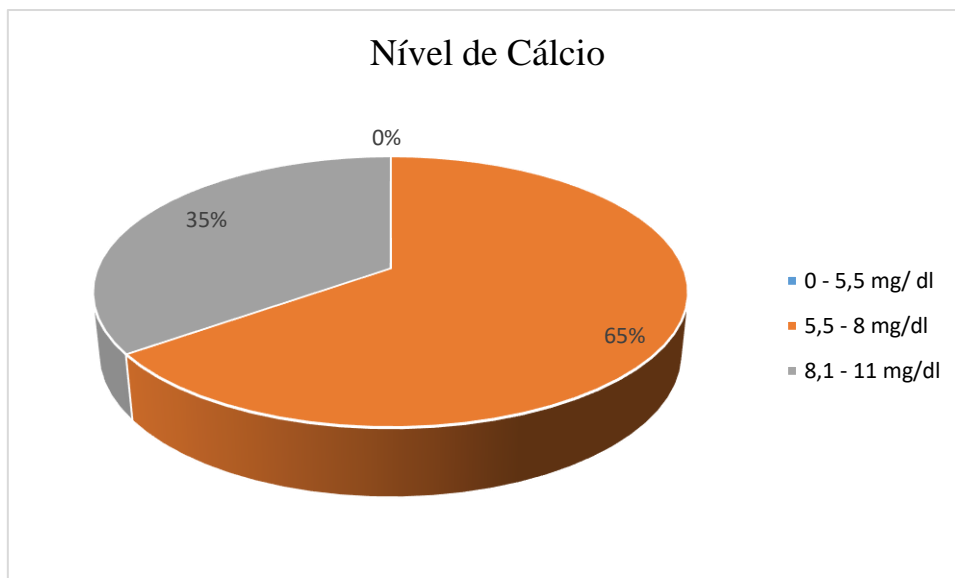


Gráfico 3 - Distribuição dos Animais da vac. A pelos Intervalos dos Valores de Cálcio

10.2. Incidência de patologias no período do puerpério na vacaria A

Foi realizado o teste de Qui-quadrado para demonstrar estatisticamente a correlação, positiva ou negativa entre a hipocalcemia subclínica e a ocorrência de afeções puerperais. Com um valor de $p = 0,05$ as hipóteses formuladas foram:

Para a vac. A as hipóteses foram:

Ho= não existe associação dos valores de Ca da vac. A e a presença de patologia(s);

H1= existe associação dos valores de Ca da vac. A e a presença de patologia(s);

10.2.1. Metrite

Referente à incidência de metrite, dos 20 animais em estudo, 9 desenvolveram metrite até 30 dias pós-parto. Desses 9 animais, 6 deles apresentavam, concomitantemente, níveis de Ca coincidentes com hipocalcemia subclínica (46%), enquanto 3 animais apresentavam valores superiores a 8 mg/dl (Gráfico 4). No entanto, não foi possível correlacionar significativamente a patologia com a carência em Ca ($\alpha = 0,637$), rejeitando H1.

Dos 3 animais que apresentaram metrite com valores de Ca superiores a 8 mg/dl, um apresentou o valor no limiar inferior do intervalo de normocalcemia (8,1mg/dl), e foi diagnosticado, concomitantemente, com um caso de retenção placentária (Gráfico 5).

10.2.2. Deslocamento de abomaso à esquerda

No decorrer do estudo, na vac. A apenas existiu um animal que foi diagnosticado com DAE. Relativamente à relação com os níveis de calcémia, não foi possível definir uma correlação pois o animal apresentava níveis de normocalcémia apesar do DAE, não sendo possível correlacionar (Gráfico 4). No caso da avaliação da associação entre DAE com hipocalcémia subclínica, não existiu suficientes casos no decorrer do ensaio clínico para serem conduzidos testes estatísticos e justificar, ou não, a associação entre as patologias e o deficit mineral.

10.2.3. Mastite

No caso da incidência de mastites, foram diagnosticados 3 casos entre a população da amostra no decorrer do ensaio clínico. Desses 3 animais, todos apresentavam níveis coincidentes com uma situação de hipocalcémia subclínica (23%), sendo que o 3º animal apresentava um nível de Ca igual ao limite superior do intervalo de referência (8 mg/dl) (Gráfico 4).

No caso das mastites, o valor de α foi superior não rejeitando H0. Como tal o valor de Ca não foi significativo no aparecimento de mastites nas vacarias.

Com o alargamento do intervalo de referência para casos de hipocalcémia subclínica, foram conduzidos novos testes qui-quadrado.

10.2.4. Retenção placentária

Semelhante à situação da incidência de DAE, a ocorrência de retenção placentária, foi apenas de um caso confirmado. Esse animal apresentava um nível de cálcio de 8,1 mg/dl, enquadrando-se no limiar do intervalo de referência.

Dos 13 animais com valores compreendidos dentro do intervalo de referência para a hipocalcémia subclínica, 6 deles não apresentaram qualquer patologia avaliada no decorrer do estudo (46%).

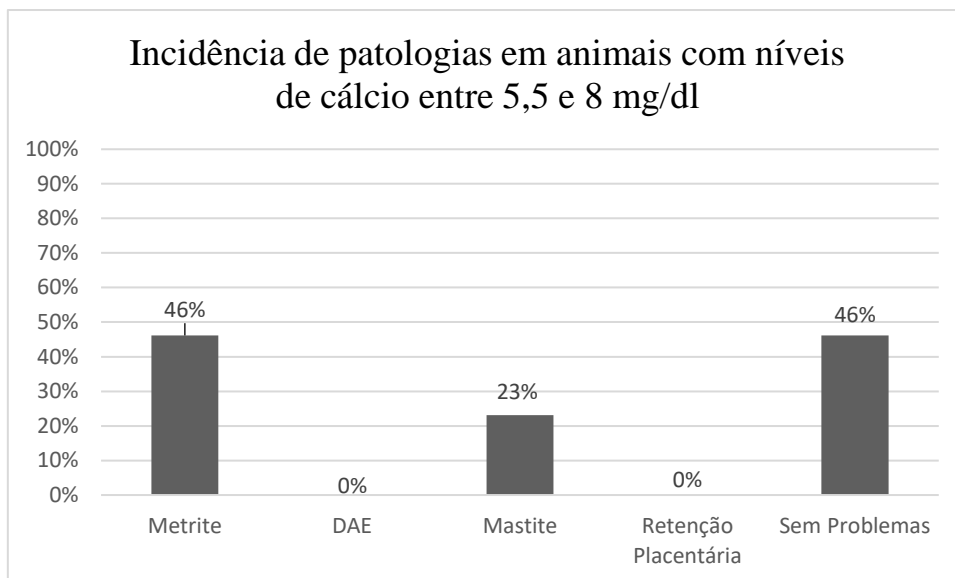


Gráfico 4 - Incidência de Patologias em Animais com Valores de Calcémia entre 5,5 – 8 mg/dl

Referente aos animais com valores de normocalcémia, dos 7 animais com valores de Ca superiores a 8 mg/dl, 5 deles apresentaram as patologias, avaliadas e diagnosticadas, no decorrer do estudo (Gráfico 5).

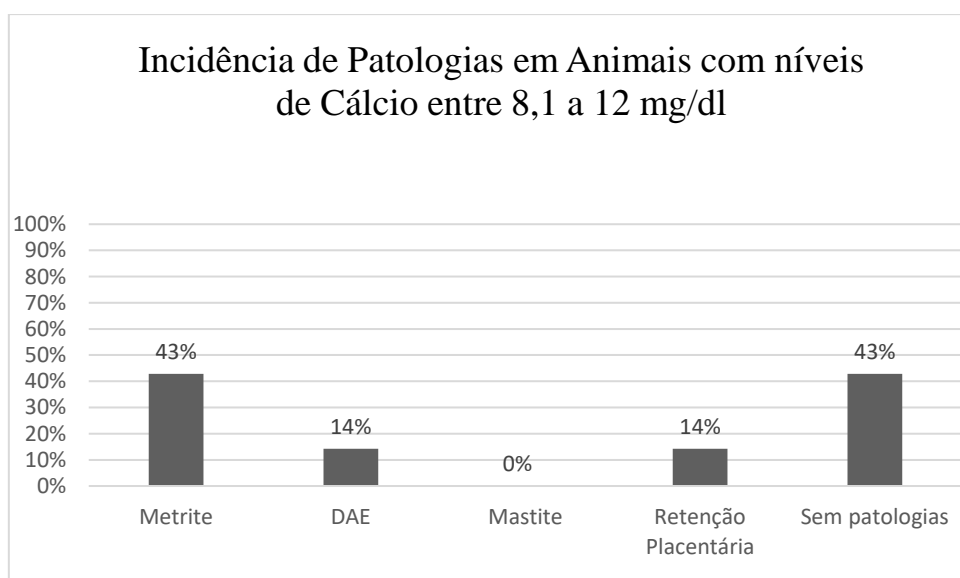


Gráfico 5 - Incidência de Patologias em Animais com Valores de Calcémia superiores a 8 mg/dl

10.3. Valores de calcémia da vacaria B

No caso da vac. B, foram recolhidas 30 amostras sanguíneas das vacas paridas de um efetivo de 146 animais lactantes. O intervalo de confiança válido de calcémia para o efetivo B foi de 7,172 até 8,168 mg/ dl.

Analisando o parâmetro dos valores de Ca, foi possível constatar que a média dos valores residia em 7,67 mg/dl +/- 0.84 mg/dl. Relativamente à média da quantificação dos valores de Ca foi

possível aferir que da amostragem de 30 animais na vac. B, 8 apresentaram níveis de calcemia dentro do intervalo de referência (27%), sendo que 22 animais (73%) apresentavam níveis de cálcio inferiores a 8 mg/dl (Gráfico 6).

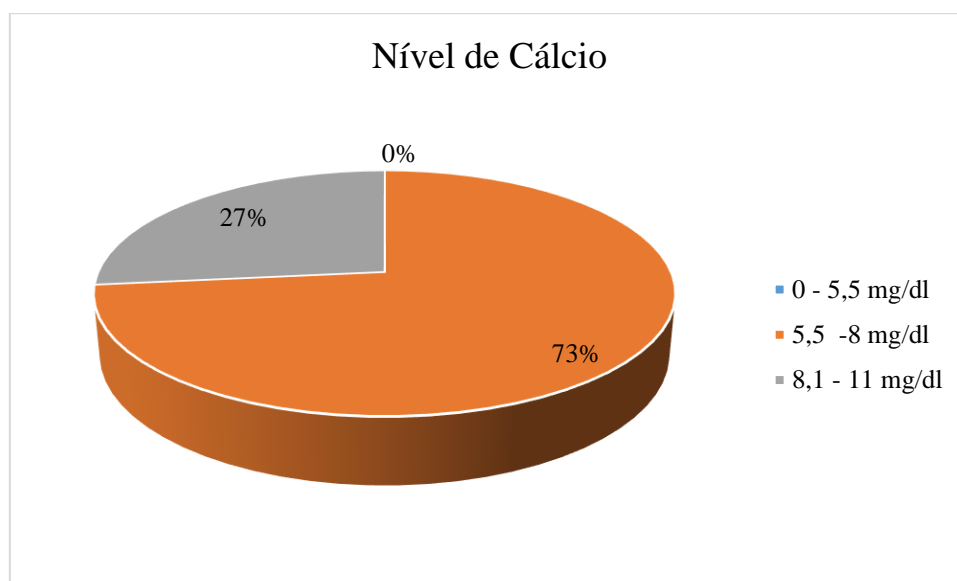


Gráfico 6 - Distribuição dos Animais da vac. B pelos Intervalos dos Valores de Cálcio

10.4. Incidência de patologias no período do puerpério na vacaria B

Para a vac. B, as hipóteses foram:

Ho= não existe associação dos valores de ca da vac. B e a presença de patologia(s);

H1= existe associação dos valores de ca da vac. B e a presença de patologia(s);

10.4.1. Metrite

Relativamente à incidência de metrite, na vac. B 16 animais foram diagnosticados com metrite (68%). Realizado o teste de Qui-quadrado:

Tabela 14- Teste de Qui-Quadrado entre Ca vs Metrite da vac. B

| Cálcio | SIM | NÃO | Total |
|---------|-----|-----|-------|
| 6,2-7 | 5 | 0 | 5 |
| 7-7,8 | 8 | 6 | 14 |
| 7,8-8,6 | 3 | 4 | 7 |
| 8,6-9,4 | 0 | 4 | 4 |
| | 16 | 14 | 30 |

Desses 16 animais, 15 apresentavam níveis de Ca coincidentes com hipocalcemia subclínica, afirmando uma correlação significativa entre ambos ($\alpha=0,025133$).

10.4.2. Deslocamento de abomaso à esquerda

Em relação à incidência de DAE, durante o estudo foram diagnosticados 2 animais com DAE (9%). Ambos os animais apresentavam níveis de Ca coincidentes com hipocalcemia subclínica (Gráfico 7). Não existiu suficientes casos, no decorrer do ensaio clínico para serem conduzidos testes estatísticos e justificar, ou não, a associação entre as patologias e o deficit mineral.

10.4.3. Mastite

Referentemente à incidência de mastites, 8 casos clínicos foram confirmados (36%). Todos eles apresentavam níveis de hipocalcemia iguais ou inferiores a 8 mg/dl. O valor de α foi superior ao pvalue respeitado, não rejeitando H0

10.4.4. Retenção Placentária

No caso da ocorrência de retenção placentária, 2 animais não libertaram as membranas fetais após 12 horas do parto. Destes 2, apenas uma vaca apresentava níveis de hipocalcemia subclínica (Gráfico 7).

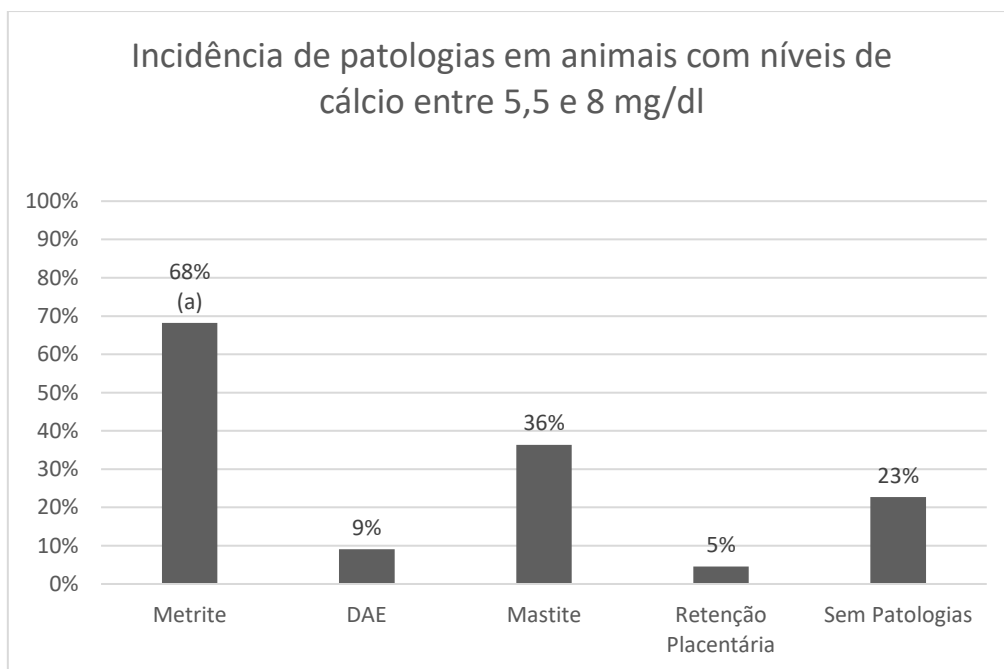


Gráfico 7 - Incidência de Patologias em Animais com Valores de Calcemia entre 5,5 – 8 mg/dl

(a)- A incidência de hipocalcemia subclínica foi correlacionada significativamente com a incidência de metrite ($\alpha < 0,05$)

Analisando os animais com níveis de ca compreendidos entre o intervalo de 8,1 a 12 mg / dl, foi possível constatar que dos 8 animais, apenas 2 desenvolveram algum tipo de patologia, sendo que desses, 6 vacas (75%) não apresentaram qualquer patologia no decorrer do estudo.

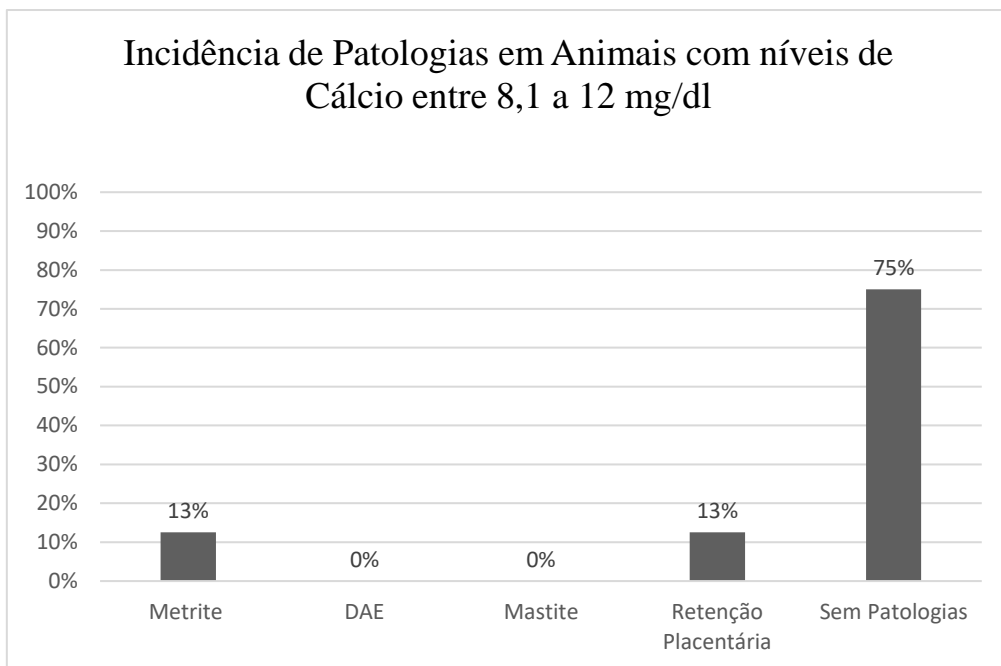


Gráfico 8- Incidência de Patologias em Animais com Valores de Calcémia superiores a 8 mg/dl

10.5. Intervalo de referência para hipocalcémia subclínica entre 5,5 até 8,5 mg/dl

10.5.1. Valores de calcémia da Vacaria A

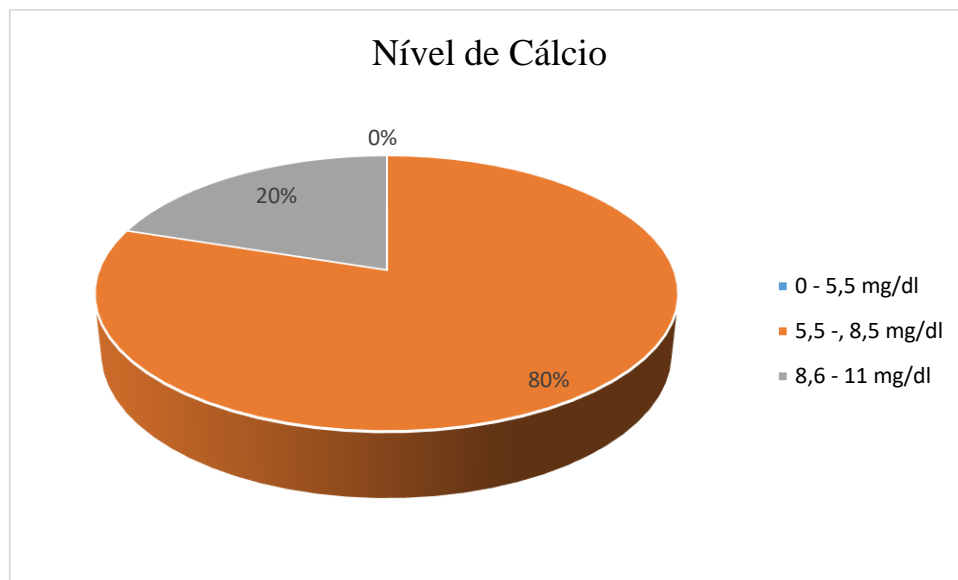


Gráfico 9 - Distribuição dos Animais da vac. A pelos Intervalos dos Valores de Cálcio

10.5.2. Incidência de patologias no período do puerpério na vacaria A

Tabela 15- Distribuição da Incidência de Patologias em Animais com Valores de Ca Compreendidos entre 5,5 – 8,5 mg/dl na vac. A

| Valores de ca 5,5 - 8,5 mg/dl | Metrite | DAE | Mastite | Retenção Placentária | Sem Patologias |
|-------------------------------|---------------|----------|---------------|----------------------|----------------|
| Freq. Relativa | 0,4375 | 0 | 0,1875 | 0,0625 | 0,5 |
| Freq. Absoluta | 7 | 0 | 3 | 1 | 8 |

Referente à incidência de metrite, foram novamente formuladas as hipóteses:

✓ **Para a vac. A as hipóteses foram:**

Ho= não existe associação dos valores de Ca da vac. A e a presença de patologia(s);

H1= existe associação dos valores de Ca da vac. A e a presença de patologia(s);

No caso da incidência de metrite, na vac. A com a execução do teste estatístico não foi possível constatar uma associação entre a calcemia e surgimento de metrites, constatando um valor de ($\alpha > 0,05$).

No que diz respeito à incidência de mastites, na vac. A:

Tabela 16- Teste de Qui-Quadrado entre Ca vs Mastite da vac. A

| Cálcio | SIM | NÃO | Total |
|---------------|------------|------------|--------------|
| 5,6-8,5 | 3 | 12 | 15 |
| 8,5-10,7 | 0 | 5 | 5 |
| | 3 | 17 | 20 |

Com um pvalue $< 0,05$ ($\alpha = 0,101841$) foi possível constatar a significância entre a incidência de hipocalcemia subclínica e a incidência de mastites na vac. A.

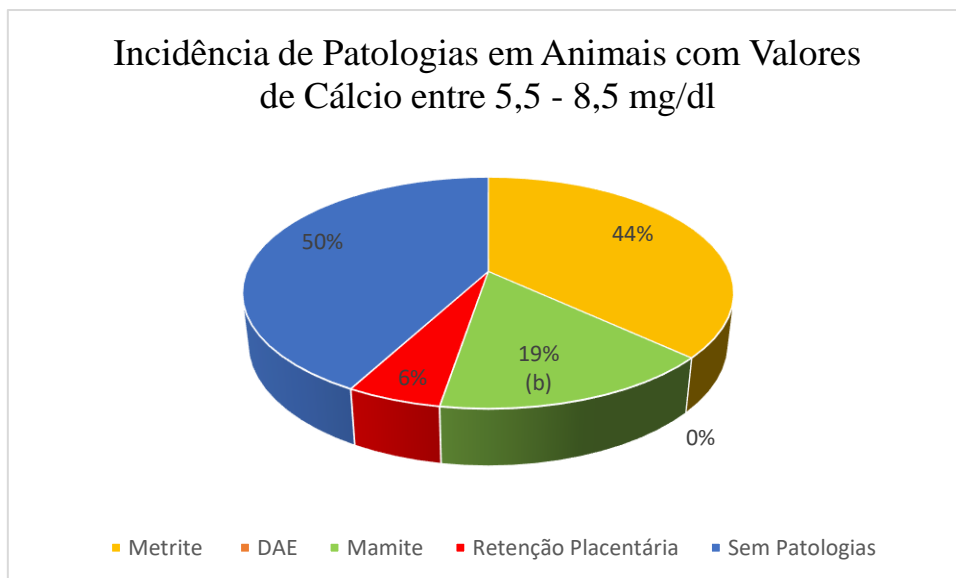


Gráfico 10 - Distribuição da Incidência de Patologias em Animais com Valores de cálcio compreendidos entre 5,5 – 8,5 mg/dl na vac. A

(b)- com um valor de $\alpha = 0,101841$ foi possível constatar a significância entre a incidência de hipocalcemia subclínica e a incidência de mastites na vac. A

Referentemente à incidência de DAE e retenção placentária, não foram obtidos suficientes dados para fazer a extrapolação e análise estatística dos mesmos.

10.5.3. Valores de Calcemia da Vacaria B

No que diz respeito à vac. B, as vacas normocalcêmicas foram de apenas 4 numa amostragem de 30 indivíduos.

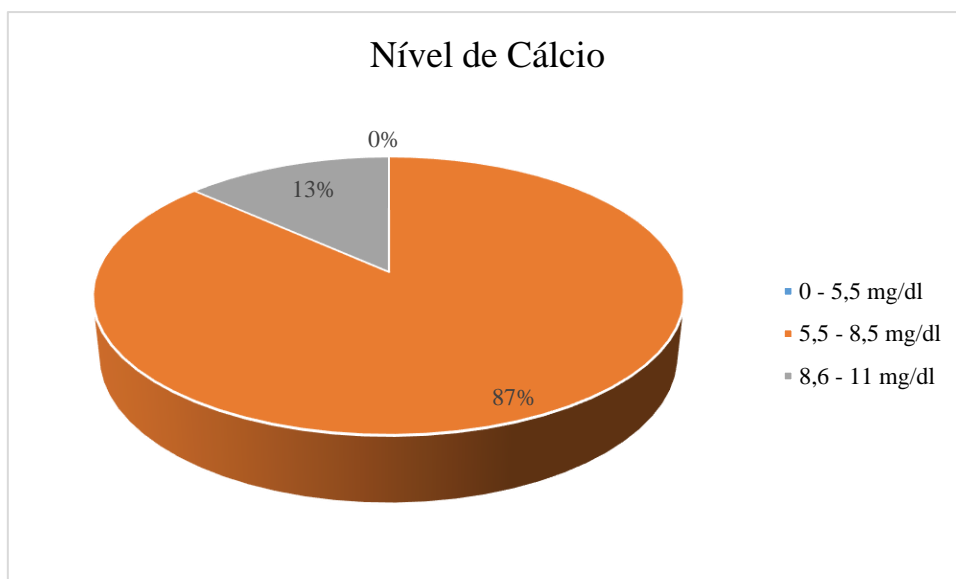


Gráfico 11 - Distribuição dos Animais da vac. B pelos Intervalos dos Valores de Cálcio

10.5.4. Incidência de patologia no período do puerpério na vacaria B

✓ Para a vac. B, as hipóteses foram:

Ho= não existe associação dos valores de Ca da vac. B e a presença de patologia(s);

H1= existe associação dos valores de Ca da vac. B e a presença de patologia(s);

Tabela 17- Teste de Qui-Quadrado entre Ca vs Metrite da vac. B

| Cálcio | SIM | NÃO | Total |
|---------------|------------|------------|--------------|
| 6,2-8,5 | 16 | 10 | 26 |
| 8,5-9,4 | 0 | 4 | 4 |
| | 16 | 14 | 30 |

Com um valor de $\alpha = 0,021637$ ($\alpha < 0,05$) foi possível comprovar uma correlação positiva entre a incidência de hipocalcemia subclínica com aparecimento de metrite, aceitando H1.

Relativamente à incidência de patologias, esta diminuiu devido ao maior número de representantes, dentro do intervalo de referência da hipocalcemia.

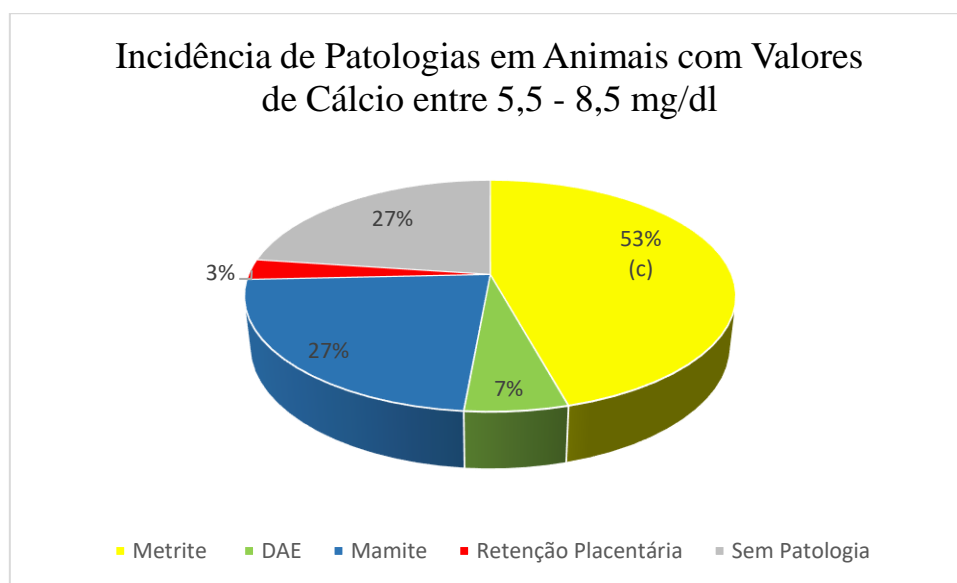


Gráfico 12 - Distribuição da Incidência de Patologias em Animais com Valores de ca Compreendidos entre 5,5 – 8,5 mg/dl na vac. B

(c)-Com um valor $\alpha = 0,021637$ ($\alpha < 0,05$) foi possível comprovar uma correlação positiva entre a incidência de hipocalcemia subclínica com aparecimento de metrite, aceitando H1.

Referentemente à incidência de DAE e retenção placentária, não foram obtidos suficientes dados para fazer a extrapolação e análise estatística dos mesmos.

10.6. Correlação entre os valores de fósforo e os valores de cálcio na vacaria A

No que diz respeito ao P, na vac. A foram recolhidas 20 amostras e medido o nível de P inorgânico presente nas mesmas. Foi realizado um teste T para fazer a comparação entre as médias dos valores de Ca e a média dos valores de P;

A realização do teste T passou primeiramente pela formulação de hipóteses, testando duas amostras, presumindo variáveis equivalentes.

✓ Na vac. A foram formuladas as hipóteses:

$H_0 = \mu$ valores de Cálcio = μ valores de Fósforo;

$H_1 = \mu$ valores de Cálcio \neq μ valores de Fósforo;

Tabela 18- Teste T de Comparação entre as Médias de Ca vs Médias do P, na vac. A

| <i>Teste T</i> | <i>Valores cálcio</i> | <i>Fósforo</i> |
|---------------------------------------|-----------------------|----------------|
| Média | 7,83 | 5,135 |
| Variância | 1,646421053 | 1,132921 |
| Observações | 20 | 20 |
| Variância agrupada | 1,389671053 | |
| Hipótese da diferença de média | 0 | |
| GI | 38 | |
| Stat t | 7,229408477 | |
| P(T<=t) uni-caudal | 6,02998E-09 | |
| t crítico uni-caudal | 1,68595446 | |
| P(T<=t) bi-caudal | 1,206E-08 | |
| t crítico bi-caudal | 2,024394164 | |

Com valor de $\alpha < 0,05$, foi rejeitada a H_0 .

Os valores de P foram separados consoante o nível de calcémia dos animais, diferenciando consoante a presença / ausência de hipocalcémia subclínica.

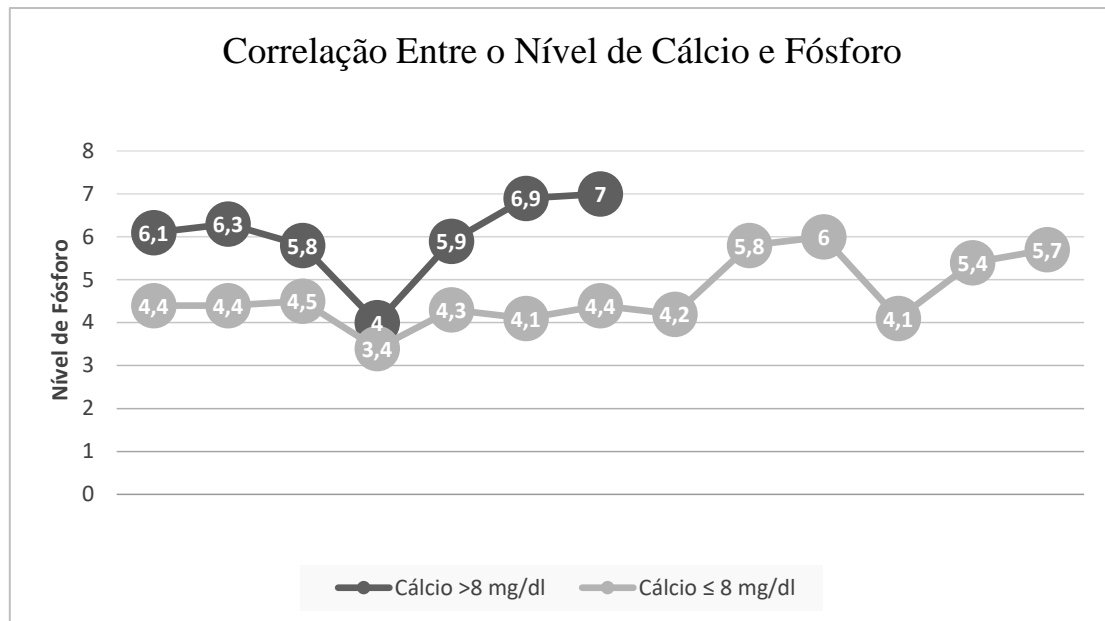


Gráfico 13 - Correlação entre os Valores de Fósforo e os Níveis de Calcémia dos Animais da vac. A

Analisando os valores de P, as 20 amostras demonstraram que a média dos níveis de P na vac. A foi de 5,135 +/- 1,064 mg/dl. O intervalo de confiança dentro dos valores de P da vac. A foi entre 4,67 – 5,60 mg/ dl.

A cinzento claro, no Gráfico 13 estão representados os valores de P dos animais com valores de Ca entre os 5,5 e 8 mg/dl. De notar que o valor mínimo do P, está inserido no intervalo dos animais com hipocalcémia subclínica, referindo o valor mínimo do P de 3,4 mg/ dl coincidente com um valor de Ca de 6,6 mg/dl. Dos 13 animais representados, apenas 4 apresentaram níveis de P superiores à média, sendo que 2 desses animais apresentaram valores de Ca no limite superior do intervalo considerado para hipocalcémia subclínica.

A cinzento escuro, estão representados os valores de P das vacas normocalcémicas. De salientar que, à exceção de um animal, que apresentou um valor de P de 4 mg/dl, com um valor de calcémia de 8,8 mg/dl, todos os outros animais apresentaram valores acima da média da amostragem, coincidentes com valores de Ca superiores a 8,1 mg/dl.

10.7. Correlação entre os valores de fósforo e os valores de cálcio na vacaria B

Dos 30 animais avaliados foi possível confirmar uma média de 5,24 +/- 0,94 mg/ dl com o intervalo de confiança dos valores de P a residir entre 4,89 – 5,57 mg/dl.

Foi realizado novamente um teste T para fazer a comparação entre as médias dos valores de Ca e a média dos valores de P;

Referente à vac. B, foram formuladas as hipóteses:

$H_0 = \mu$ valores de Cálcio = μ valores de Fósforo;

$H_1 = \mu$ valores de Cálcio \neq μ valores de Fósforo;

Tabela 19- Teste T de Comparação entre as Médias de Ca vs Médias do P, na vac. B

| <i>Teste T</i> | <i>Valores de Cálcio</i> | <i>Fósforo</i> |
|--------------------------------|--------------------------|----------------|
| Média | 7,67 | 5,236667 |
| Variância | 0,722172414 | 0,889989 |
| Observações | 30 | 30 |
| Variância agrupada | 0,80608046 | |
| Hipótese da diferença de média | 0 | |
| gl | 58 | |
| Stat t | 10,49682697 | |
| P(T<=t) uni-caudal | 2,49533E-15 | |
| t crítico uni-caudal | 1,671552762 | |
| P(T<=t) bi-caudal | 4,99066E-15 | |
| t crítico bi-caudal | 2,001717484 | |

Com valor de $\alpha < 0,05$, foi novamente rejeitada a H_0 , não existindo significância entre as médias.

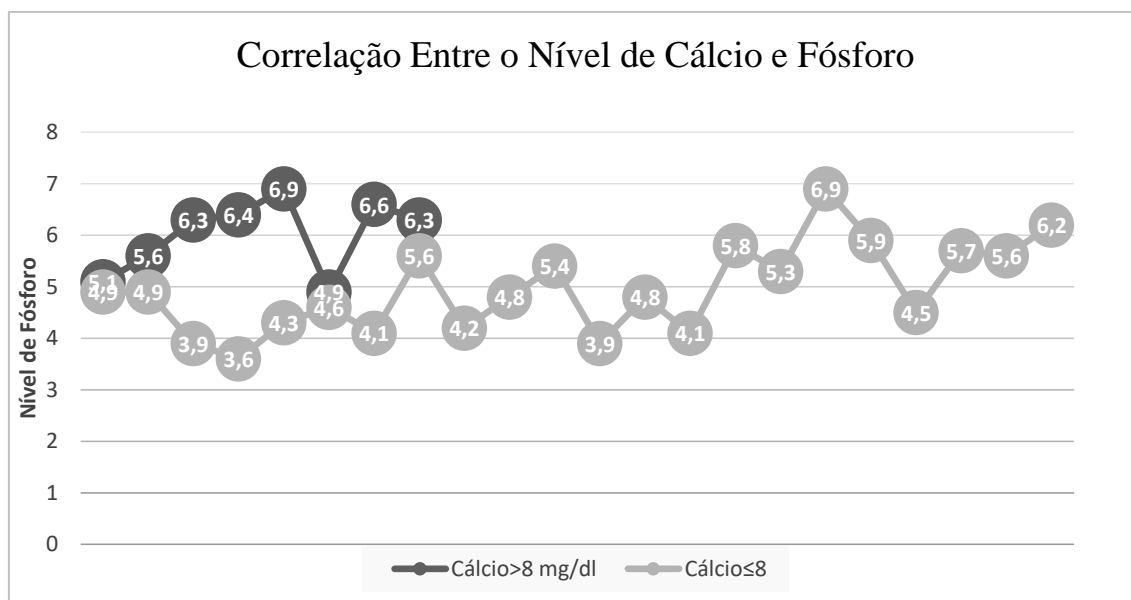


Gráfico 14 - Correlação entre os Valores de Fósforo e os Níveis de Calcemia dos Animais da vac. B

Foi possível aferir que dentro do grupo dos animais com valores de normocalcemia, apenas se registraram duas situações com valores de P inferiores ao valor médio.

11. Discussão

No início do ensaio clínico, o planejamento passava pela recolha e obtenção de 100 amostras sanguíneas, devido ao seguimento dos animais e posterior confirmação do seu momento de parição durante o decorrer do estudo. Recolhidas as 100 amostras, 5 animais foram excluídos por não respeitarem os princípios de inclusão do estudo.

Posteriormente, na parte laboratorial foram excluídas 45 amostras do ensaio clínico, pois apesar da presença de hemólise não influenciar a quantificação de Ca total, a nível do P inorgânico o princípio é diferente. Um grau de hemólise demasiado elevado leva a um falseamento da quantificação dos níveis de P, sendo culpado de um aumento na leitura dos valores. Os aumentos dos valores de P em situações de hemólise elevada devem-se à degradação da membrana fosfolipídica, ao nível eritrocitário, provocando uma libertação de P ao nível da amostra sanguínea e conduzindo, posteriormente, ao falsear dos valores obtidos (Matheus, 2014; Klop et al., 2015; Zhang et al., 2017). (Grünberg, 2014) defende que a incorreta técnica de colheita de sangue, resultando em hemólise, provoca a libertação de P inorgânico intracelular e, assim, aumenta, falsamente a medição do P. O autor completa que para além da técnica, a separação de soro ou plasma das células sanguíneas deve ser realizado dentro de 4 horas após a colheita, de modo a evitar a hemólise. A colheita atrasada de soro ou plasma resulta no aumento do P devido à hidrólise contínua de compostos orgânicos, bem como da eritrólise.

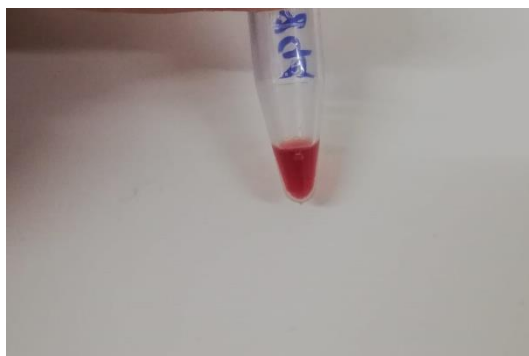


Figura 11- Amostra de Soro Sanguíneo com Evidência de Hemólise (original do autor)

O estudo incidiu sobre a medição do Ca total dos animais incluídos na amostragem. Tal decisão, foi tomada pois apenas uma fração do Ca no pool sanguíneo está prontamente disponível para as atividades biológicas e para as necessidades do animal. Essa fração passa pelo Ca ionizado, enquanto o restante é transportado no sangue interligado a proteínas, como a albumina. A influência de fatores, não avaliados no decorrer do estudo, como o papel do pH, podem constituir condições desviantes dos resultados, influenciando a concentração de Ca, caso o medido fosse a porção ionizada. Referindo (Caixeta et al., 2017) um estado de alcalinização sanguíneo pode influenciar a concentração de Ca ionizado pois influencia a ligação entre o mineral e as proteínas

transportadoras . Outro dos fatores que podem adulterar a medição dos níveis de Ca, passa pela influência que um estado de hipoproteinémia pode exercer. Uma carência ao nível proteico, como por exemplo um estado de hipoalbuminémia conduz a uma menor quantidade de proteínas transportadoras de Ca, podendo concomitantemente conduzir ao deficit de Ca ionizado, constituindo um fator que pode adulterar o resultado final.

A recolha das amostras sanguíneas dos vasos coccígeos, passou pela influência que, a excreção de P, ao nível das glândulas salivares exercia na veia jugular. Citando (Grünberg, 2014) as concentrações de P aferidas a partir do sangue colhido na veia jugular apresentam uma subida entre 4 a 19 % acima das concentrações determinadas no soro do sangue venoso coccígeo.

A recolha das amostras sanguíneas, foi realizada entre 12 a 48 horas pós-parto, devido a ser o intervalo temporal defendido por autores como (Goff, 2008; Kincaid, 2008; Venjakob et al., 2017) o tempo necessário para atingir o nadir dos níveis de Ca.

Analisando os níveis de calcémia das duas vacarias, comparativamente, existiu uma diferença na ocorrência de hipocalcémia subclínica. Consultando os gráficos referentes aos níveis de Ca das 2 vacarias podemos constatar que na vac. A 65 % dos animais apresentam níveis inferiores a 8 mg/dl enquanto na vac. B a incidência registada na amostragem passa para os 73% (Gráficos 3 e 6). Tal diferenciação pode passar por dois argumentos.

Primeiramente, as vacas da vac. B eram maioritariamente múltiparas, algumas já com 3 ou mais lactações.

Para (Caixeta et al., 2017) 73% dos animais com 3 ou mais lactações já experienciaram um estado de hipocalcémia subclínica. Concomitantemente associado e citando (R. L. Horst et al., 2010), um dos fatores mais predisponentes para a incidência de hipocalcémia, passa pela idade dos animais. Este refere que à medida que a idade dos animais avança, estes tornam-se mais suscetíveis ao deficit mineral devido à menor otimização e imediata capacidade de resposta dos mecanismos homeostáticos no combate à reversão da carência em Ca. Aliado ao facto do número de lactações estar associado com a maior quantidade de leite produzida e, conseqüentemente, maior remoção de Ca do pool plasmático, a maior incidência na vac.B pode ser resultado da maior idade dos animais associada ao maior número de lactações. Outra das hipóteses equacionadas para a justificação da diferenciação entre os valores da calcémia dos animais, passa pela avaliação do único parâmetro, onde os animais de ambas as vacarias divergem, a alimentação.

A alimentação é um dos pontos chave para a incidência ou inversamente a ausência de níveis de hipocalcémia. Consultando a tabela das recomendações nutricionais para animais no decorrer do período seco (NRC, 2010) , a três semanas do termino da gestação, é recomendado a disponibilização de 4 - 4,5 g de Ca por cada Kg de matéria seca ingerida . Fazendo a extrapolação

para o arraçãoamento que é disponibilizado aos animais, caso os valores tabelados fossem respeitados e fazendo a extrapolação para a quantidade de matéria seca que os animais estão a ingerir, no caso da vac. A os animais teriam de ingerir entre 34 a 36 g de Ca enquanto na vac. B, os animais teriam que ingerir 45,24 – 50,895 g de Ca. Comparativamente:

- ✓ Na vac. A, cada animal estava a consumir 8,5 kg de matéria seca no período seco. Cada kg de matéria seca continha 6,1 g de Ca e 3,8 g de P, o que resulta na ingestão de cerca de 49,59 g de Ca e 32,5 g de P diários.
- ✓ **Na vac. B**, cada animal estava a ingerir 11,31 kg de matéria seca que continha 6,5 g de Ca por cada kg de matéria seca e 3,6 g de P por cada Kg de matéria seca ingerido. No total, na vac. B, os animais, no período seco, estavam a consumir 73,52 g de Ca e 40,71 g de P diários.

O objetivo do manejo nutricional, no papel do controlo dos níveis de Ca passa pelo menor fornecimento possível. Quando as vacas são alimentadas com uma dieta que fornece menos Ca do que elas exigem, ficam em equilíbrio negativo de Ca. Isso causa um pequeno declínio na concentração de Ca no sangue, estimulando a secreção de PTH, que, conseqüentemente, por sua vez, estimula a reabsorção óssea osteoclástica e a produção renal de 1,25 D3. No momento do parto, os osteoclastos da vaca já estão ativos e em grande número. Assim, os animais combatem mais facilmente a necessidade deste mineral, que devido ao início da lactação é produzida, substituindo o Ca a partir do Ca ósseo. Se o Ca disponibilizado no arraçãoamento, durante o período do pré-parto provocar a estimulação prévia dos enterócitos pela 1,25 D3, permitirá uma utilização, eficiente, do Ca da dieta e a vaca evita a instauração da hipocalcémia (Goff, 2008). No entanto (Venjakob et al., 2017) defende que as vacas leiteiras precisam de cerca de 20 g de Ca por dia no final do período seco. Com o início da produção de colostro, as necessidades aumentam para 30 a 70 g por dia, dependendo da produção de leite. Devido à maior demanda de Ca, os animais vão experienciar algum grau de hipocalcémia. Com o maior suprimento de Ca através da dieta, os mecanismos homeostáticos estão inativos. Tais mecanismos para aumento da recaptção do Ca através da diminuição da excreção de Ca urinário, para aumentar a absorção de Ca ao nível intestinal e para recuperação de Ca do tecido ósseo levam cerca de 48 h até estarem plenamente ativos, podendo conduzir a uma oferta insuficiente de Ca neste período, crítico (Venjakob et al., 2017).

A constatação dos valores de Ca, que os animais da vac. B estão a ingerir excede a quantidade recomendada, em quase o dobro do seu valor (73,515 g de Ca versus 49,59 g de Ca da vac. A vs os 45,24 – 50,895 g de Ca recomendados consoante a quantidade de matéria seca ingerida). A quantidade de Ca fornecida aos animais na vac. B excede o recomendado. Como tal os mecanismos homeostáticos, principalmente dos animais da vac. B estão inativos. Aquando do

aumento da necessidade em Ca, estes, conseqüentemente, irão demorar a responder à carência dos animais. A diminuição da ativação dos mecanismos e capacidade de resposta face ao deficit mineral em torno do parto, justifica a maior incidência de hipocalcemia subclínica, no âmbito da vacaria. O atraso na ativação dos mecanismos homeostáticos aliado ao facto da recolha das amostras ser realizada dentro do período de 48 horas pós-parto, os animais estejam mais suscetíveis para a incidência de hipocalcemia, neste caso, subclínica.

Foi possível constatar a diferença entre os valores de matéria seca ingeridos pelos animais em ambas as vacarias. Os resultados mostram que existe a possibilidade que os animais da vac. A estejam a ingerir uma quantidade deficiente de matéria seca. Estes valores podem ser explicados pelo facto da maioria do efetivo dos animais presentes no parque das secas serem novilhas. A capacidade de ingestão das novilhas comparativamente a uma vaca adulta é inferior em cerca de 15 a 20 % menos, o que explica a menor quantidade de matéria seca ingerida.

Os valores percentuais representados graficamente nos gráficos 4, 5, 6 e 7 correspondem à incidência das patologias nos animais integrantes do estudo. No entanto, no somatório de todas as percentagens não é atingido o valor percentual de 100% devido à coexistência entre diversas patologias no mesmo animal.

A confirmação do deficit mineral predispõe os animais à maior influência de fatores metabólicos e infecciosos no início da lactação (Goff, 2008). Considerando esse fator como uma porta de entrada para diversas patologias do foro reprodutivo/produtivo, foi possível, em ambas as vacarias, associar a incidência de hipocalcemia subclínica com o aparecimento de metrite. Isto foi verificado principalmente na vac. B com 15 animais com níveis de hipocalcemia a desenvolverem metrite, demonstrando uma incidência de 68%, dentro dos 22 animais com valores de Ca inferiores a 8 mg/dl (gráfico 7).

Após o parto, a contaminação do útero com bactérias é inevitável, no entanto, nem todas as vacas desenvolvem metrite ou metrite puerperal. A persistência do útero contra a instauração de um quadro de infeção e o desenvolvimento da doença dependem grande parte da carga bacteriana, patogenicidade dos microrganismos e mecanismos de defesa do útero (Sheldon et al., 2006).

Num estudo de (Martinez et al., 2012) defendem que existe uma redução no número de neutrófilos e na sua capacidade fagocítica, em vacas afetadas por hipocalcemia. (Martinez et al., 2012) acrescenta mesmo, citando (Hammon et al., 2006) que devido às necessidades provenientes do pós-parto, associado com o início da lactação, coexiste uma diminuição da ingestão que, concomitantemente com a incidência de hipocalcemia, compromete o status energético dos animais, conduzindo à diminuição do nível do glicogénio intracelular presente nos neutrófilos. Em associação, é defendido que a capacidade da resposta imunitária ao nível celular está diminuída ou mesmo suprimida pela redução da concentração de Ca ao nível citosólico e aumento

do cortisol ao nível plasmático. Esta diminuição da resposta imunitária dos animais vai conduzir à maior predisposição para o surgimento de patologias.

Somado com a diminuição da capacidade da resposta imunitária, um animal com deficit em Ca vai apresentar uma redução na capacidade de contração ao nível da musculatura lisa dos órgãos. Uma diminuição da contração, ao nível uterino, dificulta a capacidade que as vacas possuem na limpeza dos restos provenientes do parto. Uma maior inércia uterina, vai assim predispor à maior incidência de metrite. Num estudo de (Martinez et al., 2012), estes defendem que animais com valores de Ca coincidentes com os intervalos de hipocalcémia subclínica apresentaram uma incidência/risco de metrite de 66,6% , coincidente com os valores obtidos, ao nível da incidência de metrites nos animais inseridos neste estudo.

Ao nível da incidência de DAE em associação com hipocalcémia subclínica, não foi significativo o papel do deficit mineral na incidência de DAE. O número reduzido de casos registados, não permitiu realizar qualquer extrapolação. No entanto, é possível que os níveis de Ca suficientemente baixos no sangue, sejam capazes de alterar a capacidade de contração da musculatura lisa, alterando o tónus abomasal. Porém, autores como (Chamberlin et al., 2013) defendem que não provaram a significância entre um estado de hipocalcémia subclínica e a incidência de DAE. Uma das limitações do estudo passa pela reduzida quantidade de dados. Maior número de dados coincidiria com mais informação e possibilidade de confirmação, ou não, da associação entre ambas.

Avaliando à incidência de mastites, no decorrer do ensaio clínico, os valores de Ca demonstraram um papel significativo no aparecimento da patologia, em ambas as vacarias. As mastites possuem uma elevada possibilidade de fatores etiológicos para o aparecimento da infeção da glândula mamária. Um dos fatores que impera e potencia uma maior predisposição para o surgimento de mastites prende-se com o facto dos animais, após o parto, experienciarem algum grau de imunossupressão devido ao período crítico em torno do momento de parição. Com a diminuição da concentração de Ca existe uma diminuição da capacidade da resposta oxidativa e ação dos neutrófilos. Vacas que desenvolvem hipocalcémia puerperal têm concentrações plasmáticas elevadas de cortisol comparadas com animais que não desenvolveram a doença. As altas concentrações podem exacerbar a imunossupressão, geralmente presente no pós-parto, incluindo a supressão da expressão de genes associadas à produção de citoquinas para mediação da resposta inflamatória (Jesse et al., 2016). Associado à imunossupressão, após o fim da ordenha é essencial que ocorra a contração do músculo esfíncter do teto, responsável pelo encerramento do teto, evitando assim a possibilidade de entrada ou conspurcação do canal do mesmo. Com os mecanismos de contração muscular diminuídos, consequência da menor concentração de Ca no pool sanguíneo, sujeita, facilmente, a exposição dos tecidos da glândula mamária a fatores

etiológicos causadores de mastites, predispondo os animais à ocorrência da afeção (Almeida, 2010).

(Martinez et al., 2012) demonstrou uma menor capacidade de resposta imunitária por parte de animais hipocalcémicos. (Kincaid, 2008) reforçou que devido ao aumento da concentração de cortisol ao nível sanguíneo, a resposta imunitária, dos animais, face aos estímulos encontra-se diminuída. Tal facto demonstrou que os animais hipocalcémicos estão mais predispostos para a ação dos agentes patogénicos e consequentemente para a incidência de patologias como mastites. Com o alargamento do intervalo, respeitando os valores de 5,5 a 8,5 mg/dl defendidos por (Rodríguez et al., 2017), foi possível correlacionar positivamente a associação entre os valores de Ca do intervalo com a incidência de mastites, no âmbito da vac. A

Ao nível da incidência e associação de retenção placentária com hipocalcémia subclínica não foi determinada qualquer associação, não sendo possível analisar os resultados devido ao diminuto número de incidências de retenção de placenta. Tal facto pode ser justificado com um parâmetro não avaliado no decorrer do estudo. Por prática comum, no âmbito das duas vacarias, aquando do momento do parto e confirmação da não expulsão das membranas fetais, os funcionários administram prostaglandina (PGF-2 α), numa administração única de 5 ml por via intramuscular. Diversos autores defendem que a administração de PGF- 2 α numa fase precoce, posteriormente ao parto reduz a incidência de retenção placentária, estimulando as contrações ao nível uterino e favorecendo uma maior facilidade de eliminação das membranas fetais(Eduardo & Horta, 2000; FORMIGAL, 2011).

No decorrer do estudo um dos animais, no âmbito da recolha das amostras sanguíneas na vac. B, desenvolveu hipocalcémia clínica. Este animal apresentava valores de Ca de 6,8 mg/dl. Este valor está inserido em todos os intervalos de calcémia referidos bibliograficamente, para animais com hipocalcémia subclínica. Porém este animal foi diagnosticado com um caso de hipocalcémia clínica. Tal facto pode estar relacionado com o esta ser a vaca mais antiga que foi aleatoriamente inserida no ensaio clínico na vac.B.

Um dos fatores predisponentes para a incidência da hipocalcémia (clínica ou subclínica) passa pela idade. Animais com idade mais avançada acabam por desenvolver menor quantidade de recetores das hormonas encarregues da manutenção dos valores de normocalcémia, no animal.

Um menor número de recetores hormonais, nos locais onde ocorre a absorção do mineral mais eficientemente, dispõem o animal para uma maior possibilidade de desenvolver hipocalcémia, neste caso, clínica.

Porém, determinados autores, como (Venjakob et al., 2017) diferenciam um caso clínico, comparativamente com um caso subclínico de hipocalcémia, simplesmente com o facto do animal

se apresentar ou não em decúbito e com incapacidade de se levantar, defendendo o mesmo intervalo, de 8 mg/dl, para ambas as situações. No entanto, a representatividade do caso clínico no estudo determinou uma percentagem de 3 % dentro da população da amostra. (DeGaris & Lean, 2008) defendem que percentualmente, os casos de hipocalcémia clínica dentro dos rebanhos, desde América do Norte, Europa e Austrália demonstram uma prevalência entre os 2 a 5 %.

Com o alargamento do intervalo de referência para 5,5 até 8,5 mg/dl defendido por (Rodríguez et al., 2017), a incidência de casos de hipocalcémia subclínica aumentaram (Gráficos 9 e 11). (Rodríguez et al., 2017) constatou que no seu ensaio clínico, que abrangeu 764 vacas, 611 animais demonstraram valores de Ca dentro do intervalo para hipocalcémia subclínica, correspondendo a 78% dos animais inseridos no estudo. Os valores obtidos na vac. A, onde 80% do efetivo demonstrou valores de hipocalcémia subclínica vão de encontro com os dados obtidos no estudo de Rodriguez et al (Gráfico 9).

Com o alargar do intervalo, a incidência de hipocalcémia subclínica foi mais acentuada, na vac. B, com 87% do efetivo a demonstrar valores de Ca inferiores a 8,5 mg/dl (Gráfico 11). Consequentemente, o aumento da incidência, veio apoiar os argumentos defendidos relativamente aos fatores predisponentes da idade e principalmente da alimentação.

Relativamente à interligação entre os níveis de Ca e os níveis de P, não foi possível correlacionar positivamente a influência que o P possui aquando do deficit de Ca. É possível suspeitar da interligação entre os deficits de ambos, observando o gráfico 13 e 14 e constatando que a distribuição dos níveis de P em vacas hipocalcémicas foram inferiores aos valores obtidos perante a comparação com os animais normocalcémicos (Gráfico 13 e 14).

Com a confirmação do caso de hipocalcémia clínica, ficou registado o valor mais baixo de P (3,6mg/dl). Tal facto reforça a necessidade da administração de P aquando da instalação da terapêutica para fazer face à síndrome de vaca caída. A confirmação do valor de P inferior aos intervalos de referência, faz suspeitar da concomitância entre um caso de hipocalcémia clínica com hipofosfatémia.

Devido à importância que o P e o role de papéis que interpreta na homeostasia das vacas, uma diminuição dos níveis de P pode pôr em causa os mecanismos fisiológicos dos animais. Para (Grünberg, 2014) o P desempenha um papel essencial como parte integrante da constituição estrutural ao nível celular promovendo a rigidez e capacidade estrutural aos tecidos . O autor defende também que o P participa no transporte e armazenamento de energia nas células através de ligações entre os metabolitos e o fosfato, formando moléculas de ATP.

Porém, é defendido que com a restauração da homeostasia dos níveis de Ca, a homeostasia do P é retomada devido à descida dos valores de PTH em circulação que posteriormente vão promover a secreção de P ao nível salivar, contribuindo assim para a ocorrência do déficit mineral. Com a restauração dos valores de calcémia a motilidade ao nível gástrico volta também a ser restabelecida, que permite a absorção de P dietético e reabsorção de secreções de saliva P (Grünberg, 2014).

Vários são os princípios que suportam a suspeita da interação entre ambos os minerais e a ação do P nos casos de hipocalcémia. Primeiramente, passa pela relação entre as hormonas que controlam a homeostasia de ambos os minerais, desempenhando papéis diferenciados nas mesmas, no entanto interligadas. Ao passo que, o aumento da hormona peptídica, PTH, na homeostasia do Ca reforça a sua captação, aquando da homeostasia do P esta desenvolve um papel no aumento da excreção do mesmo através da urina e principalmente, saliva. A ação da PTH passa pelo aumento da reabsorção óssea de Ca através da estimulação osteoclástica. No entanto a ação osteoclástica vai produzir um aumento dos níveis de P em circulação. Para não ocorrer um caso de hiperfosfatémia, a PTH estimula concomitantemente a excreção de P, ao nível salivar. Devido ao conteúdo salivar ser rico em saliva, a quantidade de P excretada pode facilmente causar hipofosfatémia (Grünberg, 2014).

Outro fator que pode suportar a situação, passa pela ação do principal mecanismo de transporte de P, presente no túbulo proximal, mantido pelo gradiente de sódio gerado pela bomba Na/K-ATPase na membrana basolateral, ser dependente de energia. É associado, aos casos de hipocalcémia uma diminuição nas reservas energéticas dos animais. Um esgotamento das reservas pode favorecer uma diminuição da ação do transporte mediado para os locais de absorção do P.

Um dos fatores que reforça a ligação entre os mecanismos de controlo dos minerais é a disponibilização de dietas ricas em fosfato aos animais. (Goff, 2018) defende que dietas ricas em fosfato predispõem à produção de FGF 23. Um aumento de FGF 23 vai diminuir a produção de 1,25 D3, inibindo todo o processo de síntese e formação ao inibir a atividade enzimática, na formação da vitamina. Vai, igualmente, estimular a atividade da 24-hidroxilase, levando à inativação da 1,25 D3. Ao nível da PTH, vai inibir a sua excreção, através da repressão da transcrição do gene da PTH e da inibição da secreção da paratiroide.

O papel desempenhado por esta hormona passa pela diminuição/ inibição da produção de 1,25 D3. Uma diminuição da vitamina D3 e da hormona PTH contribui para um menor aproveitamento e conseqüentemente diminuição de capacidade de captação do Ca nos locais de maior absorção através da redução das proteínas transportadoras ao nível dos enterócitos.

O tratamento usualmente preconizado passa pela restauração dos valores da calcemia do animal, através da administração de uma solução rica em Ca, ao nível endovenoso, com posterior associação com uma fonte de P ao nível intramuscular.

12. Conclusão

Neste estudo ficou demonstrado a elevada percentagem de incidência de hipocalcémia subclínica, presente em duas vacarias no concelho de Loures.

Ficou demonstrado que, os intervalos defendidos pela bibliografia consultada, podem, ambos ser aceites para referenciar as vacas leiteiras. No entanto, o intervalo mais alargado (5,5 – 8,5 mg/dl), respeitado na segunda parte da avaliação dos níveis de Ca, permitiu correlacionar significativamente uma maior concomitância entre os casos de hipocalcémia subclínica e o aparecimento de afeções do puerpério, confirmando assim que o papel da carência em Ca funciona como uma porta de entrada para as mesmas.

Apesar de não constituir objetivo do estudo, devido aos resultados obtidos, foi possível suspeitar do papel que as dietas no período pré-parto e a sua influência, possam constituir na incidência de hipocalcémia. Constatando a diferenciação entre os valores de Ca que os animais estão a ingerir e olhando para a variação entre os valores da calcémia dos mesmos é passível de levantar a suspeita da influência e papel preponderante que a alimentação pode exercer na incidência da carência entre os valores da calcémia dos animais. No entanto, com este estudo foi possível constatar uma alteração e diferenciação nos valores de Ca disponibilizados aos animais ao nível da dieta no período seco, principalmente no âmbito da vac. B, excedendo a quantidade recomendada. Um dos motivos que fazem suspeitar uma incidência tão diminuta de casos clínicos de hipocalcémia, passa pela quantidade de Ca disponibilizada aos animais, principalmente na vac. A, respeitando os valores recomendados/tabelados.

Com o registo de um caso clínico de hipocalcémia, as vacas demonstraram uma incidência estatística coincidente com os valores referentes, relativamente a vacas, ao nível europeu.

Verificou-se também, uma ação sinérgica e concomitante entre a ocorrência de hipocalcémia subclínica e a maior percentagem de incidência de afeções do foro reprodutivo e produtivo, como metrite e mastite. O seu surgimento pode assim, estar mascarado pela ação da incidência de hipocalcémia subclínica.

Apesar de não ser possível correlacionar os valores de Ca com os valores de P, os resultados obtidos reforçam as suspeitas da correlação entre ambos pois os animais hipocalcémicos apresentaram os valores mais baixos ao nível do P, reforçando que nunca se deve descurar e resolver singularmente os casos de hipocalcémia clínica.

O ensaio clínico teve algumas limitações. Com a recolha de uma única amostra sanguínea, no espaço temporal de doze a 48 horas, defendido por autores como (Goff, 2008; Kincaid, 2008; Venjakob et al., 2017) o tempo necessário para atingir o nadir dos níveis de Ca, não foram retiradas mais amostras dentro do período mais crítico, para o animal. O ideal, para realizar uma

correta aferição dos valores da calcemia das vacas, deveria passar por uma recolha no período antes do parto, dentro das 3 últimas semanas e recolha de mais amostras no período pós-parto para assim confirmar a real situação em que os animais se enquadram, relativamente ao Ca, controlando fatores pré e pós-parto dos animais. Outra limitação do estudo passou pela ausência de dados relativamente à raça dos animais em estudo e a sua produção leiteira. O valor diminuto da população da amostragem, também acabou por constituir um desafio no momento de aferir conclusões.

Apesar destas conclusões é de todo o interesse que, futuramente se desenvolvam estudos idênticos com um maior número de animais, pois assim pode-se tirar melhores conclusões em relação aos outros parâmetros analisados.

13. Bibliografia

- Almeida, J. P. G. de. (2010). AVALIAÇÃO DA CALCÊMIA EM VACAS LEITEIRAS NO PÓS-PARTO APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE VITAMINA D3. *Disertation UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA Faculdade de Medicina Veterinária*, 1(14), 102.
- Blaine, J., Chonchol, M., & Levi, M. (2015). Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(7), 1257–1272. <https://doi.org/10.2215/CJN.09750913>
- Caixeta, L. S., Ospina, P. A., Capel, M. B., & Nydam, D. V. (2017). Association between subclinical hypocalcemia in the first 3 days of lactation and reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*, 94, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.039>
- Chamberlin, W. G., Middleton, J. R., Spain, J. N., Johnson, G. C., Ellersieck, M. R., & Pithua, P. (2013). Subclinical hypocalcemia, plasma biochemical parameters, lipid metabolism, postpartum disease, and fertility in postparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96(11), 7001–7013. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6901>
- Corbellini, C. N. (1998). Etiopatogenia e controle da hipocalcemia e hipomagnesemia em vacas leiteiras. *Seminário Internacional Sobre Deficiências Minerais Em Ruminantes*. Editora Da UFRG, Porto Alegre., 1–17.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.029>
- Divers, T. J., & Peek, Si. F. (2008). *DISEASES OF DAIRY CATTLE* (2nd ed.). Retrieved from http://www.ghbook.ir/index.php?name=فرهنگ و رسانه های نوین&option=com_dbook&task=readonline&book_id=13650&page=73&chckhashk=ED9C9491B4&Itemid=218&lang=fa&tmpl=component
- Eduardo, A., & Horta, M. (2000). *Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, Murcia*. (1994), 181–192.
- FORMIGAL, F. M. P. L. D. F. (2011). EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA HORMONA PGF2 α NOS PROBLEMAS PÓS PARTO, MAIS CONCRETAMENTE NA RETENÇÃO PLACENTÁRIA EM BOVINOS LEITEIROS. *Disertation UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA Faculdade de Medicina Veterinária*, 1–47.
- França, R. da C. (2013). *HIPOCALCEMIA SUBCLÍNICA NA VACA LEITEIRA UNIVERSIDADE DE LISBOA Faculdade de Medicina Veterinária* (Vol. 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. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76055-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76055-7)
- Goff, Jesse P. (2006). Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders. *Animal Feed Science and Technology*, 126(3–4), 237–257. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.08.005>
- Goff, Jesse P. (2008). The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Veterinary Journal*, 176(1), 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.020>
- Goff, Jesse P. (2018). Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. *Journal of*

- Dairy Science*, 101(4), 2763–2813. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13112>
- Grünberg, W. (2014a). Treatment of Phosphorus Balance Disorders. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 30(2), 383–408. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.03.002>
- Grünberg, W. (2014b). Treatment of Phosphorus Balance Disorders. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 30(2), 383–408. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.03.002>
- Hammon, D. S., Evjen, I. M., Dhiman, T. R., Goff, J. P., & Walters, J. L. (2006). Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113(1–2), 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.022>
- Heinrichs, A. J. , V. A. Ishler, R. S. A. (1996). Feeding and managing dry cows. *College of Agricultural Sciences • Cooperative Extension*, (2), 16.
- Horst, E. A., Kvidera, S. K., Al-Qaisi, M., Abeyta, M. A., Rhoads, R. P., & Baumgard, L. H. (2018). Energy Cost of Inflammation in Dairy Cows. *27Th Tri-State Dairy Nutrition Conference, 2018*, 1(515), 65–80.
- Horst, R. L., Goff, J. P., Reinhardt, T. A., & Buxton, D. R. (2010). Strategies for Preventing Milk Fever in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 80(7), 1269–1280. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(97\)76056-9](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(97)76056-9)
- Jesse, F., Chung, E., Abba, Y., Sadiq, M., Adamu, L., Hambali, I., ... Saharee, A. (2016). Therapeutic Management of Stage II Milk Fever With Retained Placenta in a Cow. *International Journal of Livestock Research*, 6(9), 5. <https://doi.org/10.5455/ijlr.20160822092817>
- Kincaid, R. (2008). Changes in the Concentration of Minerals in Blood of Peripartum Cows. *Blood*, 1–8.
- Klop, G., Dijkstra, J., & Bannink, A. (2015). Phosphorus metabolism in dairy cattle. *Livestock Research Report 910*, 1–39.
- Koch, G. M. da S. (2013). *INCIDÊNCIA E CONSEQUÊNCIAS DA HIPOCALCÊMIA SUBCLÍNICA NO PÓS-PARTO DE VACAS LEITEIRAS UNIVERSIDADE DE LISBOA Faculdade de Medicina Veterinária. 1*, 82.
- Larsen, T., Møller, G., & Bellio, R. (2001). Evaluation of Clinical and Clinical Chemical Parameters in Periparturient Cows. *Journal of Dairy Science*, 84(7), 1749–1758. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(01\)74610-3](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(01)74610-3)
- Mann, S., McArt, J., & Abuelo, A. (2019). Production-related metabolic disorders of cattle: Ketosis, milk fever and grass staggers. *In Practice*, 41(5), 205–219. <https://doi.org/10.1136/inp.l3041>
- Martinez, N., Risco, C. A., Lima, F. S., Bisinotto, R. S., Greco, L. F., Ribeiro, E. S., ... Santos, J. E. P. (2012). Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 7158–7172. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5812>
- Matheus, J. P. (2014). DEFICIÊNCIA DO FÓSFORO : IMPLICAÇÕES. *Seminário Apresentado Na Disciplina Transtornos Metabólicos Dos Animais Domésticos, Programa de Pós-Graduação Em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul*, 16.

- Neto, C. T. da R. M. (2009). ANÁLISE DE CUSTOS DURANTE O PÓS-PARTO NUMA EXPLORAÇÃO LEITEIRA EM MONTEMOR-O-VELHO. *Disertation UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA Faculdade de Medicina Veterinária*, 1(9), 88. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Neves, R. C., Leno, B. M., Stokol, T., Overton, T. R., & McArt, J. A. A. (2017a). Risk factors associated with postpartum subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(5), 3796–3804. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11970>
- Neves, R. C., Leno, B. M., Stokol, T., Overton, T. R., & McArt, J. A. A. (2017b). Risk factors associated with postpartum subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(5), 3796–3804. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11970>
- NUTRIENT REQUIREMENTS OF DAIRY CATTLE; Seventh Revised Edition, 2001* (17th ed.). (2001). Washington, D.C.: NATIONAL ACADEMY PRESS.
- NUTRITIONAL RECOMMENDATIONS FOR DAIRY COWS FED WITH TMR*. (2010). National Research Council, 2010.
- Oetzel, G. R. (2012). An update on hypocalcemia on dairy farms. *Proceedings of the Four-State Dairy Nutrition and Management Conference*, 80–85.
- Reinhardt, T. A., Horst, R. L., & Goff, J. P. (1988). Calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis in ruminants. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 4(2), 331–350. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)31052-5](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)31052-5)
- Reinhardt, Timothy A., Lippolis, J. D., McCluskey, B. J., Goff, J. P., & Horst, R. L. (2011). Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Veterinary Journal*, 188(1), 122–124. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.025>
- Rings, M. B., Rings, D. M., & Welker, B. (1997). Milk fever: Seeking new solutions to an old problem. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 19(SUPPL. 8), 6.
- Rodríguez, E. M., Arís, A., & Bach, A. (2017). Associations between subclinical hypocalcemia and postparturient diseases in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(9), 7427–7434. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12210>
- Shaver, R. D. (1997). Nutritional Risk Factors in the Etiology of Left Displaced Abomasum in Dairy Cows: A Review. *Journal of Dairy Science*, 80(10), 2449–2453. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76197-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76197-6)
- Sheldon, I. M., Lewis, G. S., LeBlanc, S., & Gilbert, R. O. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, 65(8), 1516–1530. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.021>
- Silver, J., Naveh-many, T., Wdujhw, F., Wkh, R., Exw, N., Lq, D., ... Sdudwk, W. K. H. (2012). Fgf23 and the Parathyroid. *Endocrine FGFs and Klothos, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.*, (6), 92–99.
- Song, L. (2017). Calcium and Bone Metabolism Indices. In *Advances in Clinical Chemistry* (1st ed., Vol. 82). <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2017.06.005>
- Umaña Sedó, S., Rosa, D., Mattioli, G., Luzbel de la Sota, R., & Giuliadori, M. J. (2018). Associations of subclinical hypocalcemia with fertility in a herd of grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101(11), 10469–10477. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14242>
- Venjakob, P. L., Borchardt, S., & Heuwieser, W. (2017). Hypocalcemia—Cow-level prevalence

and preventive strategies in German dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 100(11), 9258–9266. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12494>

Ziwei Zhang, Mingyu Bi, Jie Yang, Haidong Yao, Zhonghua Liu, S. X. (2017). *Effect of phosphorus deficiency on erythrocytic morphology and function in cows*. 4(1), 8. <https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.3.333>

14. Anexos

Fluxograma do Ensaio Clínico

