



UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DA CALCÉMIA EM VACAS LEITEIRAS NO PÓS-PARTO APÓS A  
ADMINISTRAÇÃO DE VITAMINA D<sub>3</sub>**

**JOÃO PAULO GONÇALVES DE ALMEIDA**

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Miguel Luis Mendes Saraiva Lima

Doutor José Augusto Farraia e Silva  
Meireles

Doutor George Thomas Stilwell

ORIENTADOR

Doutor George Thomas Stilwell

2015

LISBOA





UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DA CALCÉMIA EM VACAS LEITEIRAS NO PÓS-PARTO APÓS A  
ADMINISTRAÇÃO DE VITAMINA D<sub>3</sub>**

**JOÃO PAULO GONÇALVES DE ALMEIDA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Miguel Luis Mendes Saraiva Lima

Doutor José Augusto Farraia e Silva  
Meireles

Doutor George Thomas Stilwell

ORIENTADOR

Doutor George Thomas Stilwell

2015

LISBOA

## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor George Stilwell, por ter aceitado ser o orientador da tese, pelo seu apoio, auxílio, incentivo e sugestões. Pela sua paciência, conhecimento e pela pessoa extraordinária que é.

Ao Doutor Telmo Nunes pela preciosa ajuda no tratamento estatístico e pela inesgotável paciência.

Ao Dr. José Alface pela extraordinária paciência e enorme simpatia. Pela partilha de conhecimentos e pelo constante desafio e incentivo que o caracterizam. Ao Eng<sup>o</sup> João Diogo, ao Eng<sup>o</sup> Jorge e à Eng<sup>a</sup> Susana da Fonte de Leite, SA.

Ao Dr. João Camejo, pelo apoio e partilha de conhecimentos. E ao Sr. João da JMPC, SA pela sua simpatia e por ter permitido a realização de parte do estágio.

Ao Sr. Alexandre Arriaga e Cunha pela sua simpatia, bem receber e conhecimentos partilhados. À Aurora pela sua competência e simpatia, ao Sr. Justino e à Margarida.

À Barão & Barão por permitir a realização do ensaio clínico.

A toda a minha família mas particularmente à minha irmã Natália que sem a sua ajuda e o seu apoio dificilmente teria chegado aqui.

# **Avaliação da calcémia em vacas leiteiras no pós-parto após a administração de vitamina D<sub>3</sub>**

## **Resumo**

O peri-parto ou período de transição (4 semanas pré-parto e 4 semanas pós-parto), da vaca leiteira, é dominado por alterações metabólicas drásticas, principalmente devido às necessidades exigidas pela lactação. Este período é, portanto, de alto risco para problemas como hipocalcémia.

Para prevenção da hipocalcémia são usados vários métodos, sendo um deles a administração de vitamina D<sub>3</sub> no pré-parto tendo sido esse o que foi avaliado neste estudo. Para o estudo foram seleccionados 153 vacas, de três explorações leiteiras com duas ou mais lactações e distribuídas por dois grupos (70 para o grupo Controlo e 83 para o grupo teste). Ao grupo Teste administrou-se vitamina D<sub>3</sub> dois a oito dias antes do parto e ao grupo Controlo administrou-se um placebo (soro fisiológico) e avaliou-se a calcémia entre seis e doze horas após o parto em todos os animais. Comparou-se também a produção de leite aos cem dias, o intervalo até à primeira inseminação, o número de inseminações necessárias a uma nova gestação e a prevalência de doenças do pós-parto.

Verificou-se que a calcémia do grupo Teste foi significativamente superior à do grupo Controlo no global e em cada uma das explorações estudadas.

Verificou-se também que a associação de dietas aniónicas com a administração de vitamina D<sub>3</sub> numa das explorações teve no grupo Teste um efeito calcemiante superior quando comparado com o grupo Controlo.

Demonstrou-se ainda que as prevalências de hipocalcémia subclínica e de retenção placentária aumentam com o número de lactações, e que a retenção placentária está associada a maior risco de ocorrência de metrite. Concluimos que a administração de vitamina D no pré-parto previne hipocalcémia subclínica principalmente em animais mais velhos, sendo esse efeito mais nítido quando associado a dietas aniónicas.

**Palavras-chave:** Hipocalcémia; Vitamina D<sub>3</sub>; Cálcio; Doenças puerperais.

## **Calcemia evaluation of dairy cows in the postpartum after vitamin D<sub>3</sub> administration**

### **Abstract**

The peri -partum or transition period (4 weeks pre -partum and 4 weeks postpartum), the dairy cow, is dominated by dramatic metabolic changes, mainly due to the needs required by lactation. This period has therefore at a high risk for problems such as hypocalcaemia.

To prevent hypocalcaemia are used multiple methods, one of them is vitamin D<sub>3</sub> administration antepartum and was this which was evaluated in this study. For the study were selected 153 cows from three dairy farms with two or more lactation and distributed in two groups (70 for the control group and 83 for the test group). In the Test group it was administered vitamin D<sub>3</sub> from two to eight days before parturition and in the Control group was administered a placebo (saline solution ) and evaluated calcemia between six and twenty four hours from birth in all animals. It is also compared the first hundred days of milk production, the interval gap before the first insemination, the number of inseminations necessary for a new pregnancy and postpartum diseases.

It was found that the calcemia test group was significantly higher than in the Control group and overall in each of the farms studied.

It was also found that the combination of anionic diets with vitamin D<sub>3</sub> administration on a farm in the Test group had a higher calcemiante effect when compared to the control group.

It has been demonstrated although the prevalence of subclinical hypocalcemia and retained placenta increases with the number of lactations, and the retained placenta is associated with increased risk of metritis. We conclude that vitamin D administration during labor prevent subclinical hypocalcemia mainly in older animals, making clearer effect when combined with anionic diets.

**Keywords:** Hypocalcaemia ; Vitamin D<sub>3</sub> ; Calcium ; Puerperal diseases.

## Índice Geral

Agradecimentos .....	ii
Resumo .....	iii
Abstract.....	iv
Índice Geral .....	v
Lista de figuras .....	viii
Lista de tabelas .....	viii
Lista de gráficos.....	ix
Lista de abreviaturas .....	ix
Introdução Geral .....	1
1. Revisão bibliográfica .....	2
1.1. Vitamina D .....	2
1.2. Regulação e metabolismo da vitamina D .....	3
1.3. Vitamina D e imunidade na vaca .....	6
1.4. Fisiologia do cálcio .....	6
1.4.1. Função da hormona da paratiróide na regulação do cálcio .....	8
1.4.2. Reabsorção renal do cálcio.....	9
1.4.3. Absorção intestinal do cálcio .....	10
1.4.4. Reabsorção óssea do cálcio .....	11
1.5. Fisiologia do fósforo .....	12
1.6. Fisiologia do magnésio.....	14
1.6.1. Factores que afectam a absorção ruminal de magnésio.....	15
1.6.2. Hipomagnesiémia como factor de risco para hipocalcémia .....	16
1.6.3. Níveis ideais de magnésio no alimento .....	17
1.7. Fisiologia do potássio.....	18
1.7.1. Balanço corporal de potássio na vaca.....	19
1.7.2. Factores de risco para hipocalémia associados ao potássio.....	19

1.8. Hipocalcémia.....	20
1.8.1. Fisiopatologia da hipocalcémia.....	21
1.8.2. Sinais clínicos da hipocalcémia.....	22
1.8.3. Tratamento da hipocalcémia clínica.....	23
1.9. Factores de risco para o desenvolvimento de hipocalcémia.....	23
1.9.1. Idade da vaca.....	23
1.9.2. Predisposição de raça.....	24
1.9.3. Condição corporal.....	24
1.10. Prevenção da hipocalcémia.....	25
1.10.1. Dietas aniónicas.....	25
1.10.2. Monitorização do efeito das dietas aniónicas.....	26
1.10.3. Administração cálcio sub-cutanea.....	27
1.10.4. Dieta pobre em cálcio.....	27
1.10.5. Administração cálcio oral.....	28
1.10.6. Administração intramuscular de vitamina D.....	29
1.11. Doenças associadas à hipocalcémia.....	30
1.11.1. Distócia e retenção placentária.....	30
1.11.2. Deslocamento do abomaso, cetose e fígado gordo.....	31
1.11.3. Metrite e endometrite.....	32
1.11.4. Mastite.....	32
1.11.5. Fertilidade.....	33
2. Objectivos.....	33
3. Materiais e métodos.....	34
3.1. Descrição da exploração em estudo.....	34
3.1.1. Exploração A.....	34
3.1.2. Exploração B.....	35
3.1.3. Exploração C.....	35
3.2. Tipo de estudo.....	35



3.3. Amostra .....	35
3.4. Desenho experimental .....	36
3.5. Recolha de dados.....	37
3.6. Colheita das amostras .....	38
3.7. Análise estatística .....	38
4. Resultados .....	39
4.1. Análise dos dados totais .....	39
4.2. Análise dos dados da exploração A.....	42
4.3. Análise dos dados da exploração B.....	44
4.4. Análise dos dados da exploração C.....	46
4.5. Análise da calcémia em associação com as doenças pós-parto.....	49
4.6. Análise dos resultados tendo em conta a idade das vacas .....	50
5. Discussão.....	53
5.1. Prevalência de hipocalcémia global .....	53
5.2. Prevalência de hipocalcémia em cada vacaria .....	54
5.3. Hipocalcémia e idade da vaca .....	54
5.4. Calcémias .....	55
5.5. Produção de leite aos 100 dias, primeira inseminação pós-parto e número de inseminações....	56
5.6. Doenças puerperais .....	58
6. Conclusão .....	60
Bibliografia.....	62
Anexo 1 – Relatório de actividades de estágio.....	71
Anexo 2. Resumo das Características do Medicamento (Duphafral D <sub>3</sub> 1000 <sup>®</sup> ) .....	72
Anexo 3. Tabela de dados da exploração A .....	76
Anexo 4. Tabela de dados da exploração B.....	78
Anexo 5. Tabela de dados da exploração C.....	81

## Lista de figuras

Figura 1 - Metabolismo da vitamina D na pele, fígado e rim.....	4
Figura 2 - Regulação da homeostasia do cálcio e da vitmina D.....	5
Figura 3 - Ilustração esquemática dos sistemas que mantêm a homeostasia do cálcio. ....	7
Figura 4 - Acção da hormona da paratiróide nas células alvo.....	9
Figura 5 - Consequências da Febre do Leite e hipocalcémia subclínica. ....	30

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Quantidade de magnésio a incluir na dieta tendo em conta a sua digestibilidade e a ingestão de matéria seca .....	17
Tabela 2 - Análise descritiva dos dados totais obtidos das três explorações.....	41
Tabela 3 - Diferença na prevalência de doenças do pós-parto em vacas do grupo teste e do grupo controlo. ....	42
Tabela 4 - Análise descritiva dos dados da exploração A. ....	43
Tabela 5 - Diferença na prevalência de doenças do pós-parto em vacas do grupo teste e do grupo controlo na exploração A. ....	44
Tabela 6 - Análise descritiva dos dados da exploração B. ....	45
Tabela 7 - Diferença na prevalência de doenças do pós-parto em vacas do grupo teste e do grupo controlo na exploração B.....	46
Tabela 8 - Análise descritiva dos dados da exploração C. ....	47
Tabela 9 - Diferença na prevalência de doenças do pós-parto em vacas do grupo teste e do grupo controlo na exploração C.....	48
Tabela 10 - Estatística descritiva dos valores de calcemia (mg/dl) dos animais que sofreram doenças pós-parto. ....	50
Tabela 11 - Análise da calcémia tendo em conta o número de lactações.....	50
Tabela 12 - Diferenças entre o grupo teste e o grupo controlo no número de dias após o parto necessários até à primeira inseminação tendo em conta o número de lactações do animal. ....	51
Tabela 13 - Diferenças da calcémia tendo em conta o número de lactações do grupo controlo. ....	51
Tabela 14 - Análise da retenção placentária à medida que a vaca envelhece no grupo controlo. ....	52

## Lista de gráficos

Gráfico 1 - Prevalências da hipocalcemia subclínica do grupo teste (T) e o do grupo controle (C), de todas as vacarias estudadas.....	40
Gráfico 2 - Percentagem de vacas em hipocalcemia subclínica nas três explorações no grupo teste (T) e no grupo controle (C).....	49
Gráfico 3 - Percentagem de vacas em hipocalcemia subclínica por lactação e por grupo em estudo (T – Teste e C – Controle). Dividiram-se os indivíduos por 2 <sup>a</sup> lactação, 3 <sup>a</sup> lactação e 4 <sup>a</sup> lactação ou superior ( $\geq 4^a$ lactação).....	52

## Lista de abreviaturas

AMP - Adenosina monofosfato
AMPc - Adenosina monofosfato ciclica
ATP – Adenosina trifosfato
Ca – Cálcio
Ca <sub>i</sub> – Cálcio ionizado
Ca <sub>total</sub> – Cálcio total
CaSR – Receptores de cálcio
CC – Condição corporal
Cl – Cloro
d – Dia
dl – Decílitro
DA – Deslocamento do abomaso
DCAD – Coeficiente de catiões-aniões
1,25D <sub>3</sub> – 1,25 – hidroxivitamina D <sub>3</sub>
25D <sub>3</sub> – 25-hidroxivitamina D <sub>3</sub>
FEC – Fluido extracelular
FGF – Factor de crescimento dos fibroblastos
FIC – Fluido intracelular

g – Grama

GDP – Guanosina difosfato

HF – *Holstein-Frísia*

H<sup>+</sup> - Hidrogenião

IC<sub>95%</sub> - Intervalo de confiança a noventa e cinco por cento

IMS – Ingestão de matéria sêca

K – Potássio

Ke – Potássio extracelular

kg – Quilograma

Ki – Potássio intracelular

l - Litro

mmol – Milimole

mg – Miligrama

Mg<sup>2+</sup> - Ião magnésio

MgO – Óxido de magnésio

ml – Mililitro

min – Minuto

MS – Massa sêca

nm – Nanómetro

NH<sup>4+</sup> - Ião amónia

NRC – *National Research Council*

1- $\alpha$ -OHase – 1- $\alpha$ -hidroxilase

24-OHase – 24-hidroxilase

p – Significância

PLD – Proteínas ligantes de vitamina D

PTH – Hormona da paratiróide

PV – Peso vivo

RP – Retenção placentária

RVD – Receptores de vitamina D

S – Enxofre

SA – Sais aniônicos

TC – Tubulo colector

TCD – Tubulo contornado distal

TCP – Tubulo contornado proximal

TGI – Tracto gastrointestinal

TMR – *Total mixed ration*

UI – Unidades internacionais

UV – Ultravioleta

$\chi^2$  – Qui-quadrado

% - Percentagem

± - Mais ou menos

## **Introdução Geral**

A produção de leite em Portugal e na maioria dos países desenvolvidos aumentou substancialmente nas últimas décadas. Esse aumento produtivo não se deveu ao aumento do número de animais, já que, pelo contrário, se verificou mesmo a sua diminuição em alguns países, mas sim ao aumento de produção de leite por animal. Esse aumento é parcialmente o resultado de programas de melhoramento genético levados a cabo nas últimas décadas. Esta elevada produção trouxe consigo também alguns problemas, e talvez um dos maiores seja a hipocalcémia, conhecida também por febre do leite, *paresia puerperalis* ou hipocalcémia clínica (Bruno, 2010). A hipocalcémia clínica e subclínica são apontadas como os principais catalisadores de inúmeras doenças puerperais e conseqüentemente ligadas directa ou indirectamente à diminuição da fertilidade das vacas leiteiras, sobretudo das altas produtoras. Essa diminuição caracteriza-se principalmente pelo aumento do intervalo entre partos (Butler, 2000).

O peri-parto ou período de transição (4 semanas pré-parto e 4 semanas pós-parto) é dominado por alterações metabólicas drásticas, principalmente devido às necessidades de lactação. A vaca ao passar de um estado gestante não-lactante para um de não-gestante lactante aumenta drasticamente as suas necessidades para conseguir manter um nível produtivo cada vez maior e simultaneamente mais exigente. Associado ao aumento das exigências nutricionais e contribuindo ainda mais para o aumento do risco de doenças puerperais, a vaca leiteira normalmente passa por um período de redução da ingestão de matéria seca (IMS), o que vai provocar um balanço energético negativo mais ou menos pronunciado consoante o nível produtivo do animal. Muitas vezes na base dessa redução da IMS estão níveis baixos de cálcio (Ca) que vão afectar o funcionamento do músculo liso do tracto gastrointestinal (TGI) (Bruno *et al.*, 2010).

Este período é de alto risco para problemas como hipocalcémia, síndrome da vaca caída, cetose, edema do úbere, deslocamento do abomaso, metrite, retenção placentária (RP) e problemas de fertilidade. Estas afecções estão todas inter-relacionadas e uma boa preparação desta etapa da vida produtiva da vaca é fundamental para o bem-estar animal e para a viabilidade da exploração (DeGaris & Lean, 2008).

## 1. Revisão bibliográfica

### 1.1. Vitamina D

A vitamina D foi descoberta há cerca de um século como factor de prevenção do raquitismo (Mccollum, Simmonds & Becker, 1922). Apesar da sua descoberta, propriamente dita, ter acontecido apenas nesta altura, o seu uso terapêutico era já feito de forma empírica, quando eram prescritas exposições ao sol e óleo de fígado de bacalhau (fonte rica em vitamina D) para a prevenção do raquitismo. Mais uma vez empiricamente, os tratamentos eram também prescritos a pacientes tuberculosos, pois como se descobriu mais tarde, a vitamina D possui receptores (RVD) nas células imunes e intervém em várias respostas imunitárias, nomeadamente na destruição de bactérias endocitadas por macrófagos (Hewison, 2010).

A latitude desempenha um papel muito importante na quantidade de vitamina D sintetizada uma vez que esta está directamente relacionada com o tempo de exposição à radiação ultravioleta (UV). A produção de vitamina D aumenta nas regiões próximas do equador e em regiões de maior altitude. Diminui com o aumento da pigmentação da pele, com a sua cobertura, com vestuário e com o uso de cremes protetores solares (Henry, 2011).

Duas equipas de cientistas com experiências conduzidas em vacas e em pequenos ruminantes demonstraram que a síntese de vitamina D ocorre por toda a área da superfície corporal apesar da camada pilosa e das áreas de forte pigmentação (Hymøller & Jensen, 2010; Kovács, Wilkens, & Liesegang, 2015). A relação entre a superfície pigmentada e a concentração de vitamina D no plasma sanguíneo não se encontra estudada nos animais com pêlo pigmentado, ao contrário do que se passa nos humanos (Jablonski & Chaplin, 2012).

Além da sua contribuição para a formação óssea e para o metabolismo do Ca, nos últimos anos, percebeu-se que as funções da vitamina D vão muito além destas duas funções nos animais, nomeadamente nos animais de produção. Nos ruminantes a forma activa da vitamina D (1,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub>) promove o aumento da produção de óxido nítrico e péptidos antimicrobianos como as β-defensinas, moléculas tóxicas para as bactérias (Nelson, Reinhardt, Thacker, Beitz, & Lippolis, 2010). Existem também fortes evidências que esta vitamina contribui para a performance reprodutiva e para o

desenvolvimento da glândula mamária em humanos (Kemmis, Salvador, Smith, & Welsh, 2006).

## **1.2. Regulação e metabolismo da vitamina D**

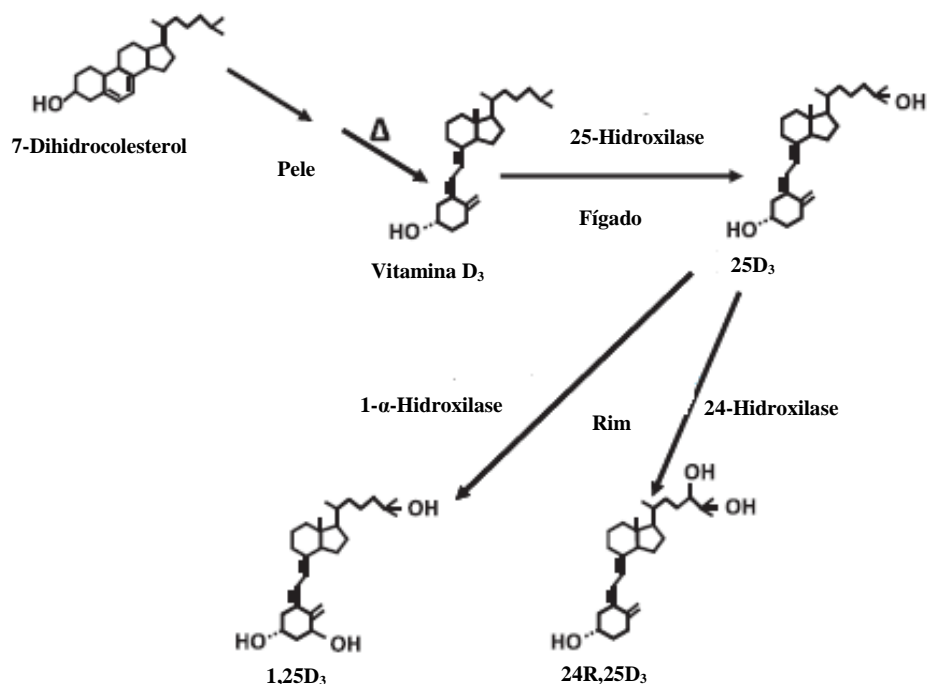
Existem duas formas de vitamina D, vitamina D<sub>3</sub> e vitamina D<sub>2</sub>, e foram detectados metabolitos de ambas as formas na corrente sanguínea de bovinos. A vitamina D<sub>2</sub> deriva do ergosterol das plantas e a vitamina D<sub>3</sub> deriva do 7-dihidrocolesterol existente na epiderme dos animais (Horst & Littledike, 1979).

A forma menos abundante, a vitamina D<sub>2</sub>, encontra-se em maior concentração em tecidos animais, nomeadamente em peixes, mas os ruminantes absorvem-no através da ingestão de plantas. Os enterócitos absorvem o ergocalciferol em quilomicrons e através da corrente linfática estes chegam à corrente sanguínea e desta viajam até ao fígado ligadas a proteínas ligantes de vitamina D (PLD) (Lo, Paris, Clemens, Nolan, & Holick, 1985; Tsiaras & Weinstock, 2011).

No entanto, a forma mais abundante da vitamina D (vitamina D<sub>3</sub>) é sintetizada através da exposição da pele à luz solar (Figura 1). As membranas das células da epiderme possuem na sua constituição o 7-dihidrocolesterol que ao ser irradiado com raios UV de comprimento de onda entre 290 e 315 nm é convertido em pré-vitamina D<sub>3</sub> que entra na circulação sanguínea, onde se liga à PLD e sendo transportada até ao fígado através da corrente sanguínea (Henry, 2011).



**Figura 1** - Metabolismo da vitamina D<sub>3</sub> na pele, fígado e rim. (Adaptado de Henry, 2011).



No fígado ambas as formas, a vitamina D<sub>2</sub> e a vitamina D<sub>3</sub>, vão servir de substrato à enzima 25-hidroxilase que as vai converter em 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (25D<sub>3</sub>) ou 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub>. A 25D<sub>3</sub> é a forma precursora da vitamina D activa mais abundante na corrente sanguínea. No entanto, apesar dos níveis de 25D<sub>3</sub> constituírem um óptimo indicador para medir os níveis de vitamina D<sub>3</sub> no organismo, a sua acção é praticamente inexistente e é uma forma fracamente regulada. Para uma boa manutenção da homeostasia do Ca o *National Research Council* (NRC) recomenda que a concentração de 25D<sub>3</sub> no sangue seja superior a 20 ng/ml. Recomenda, também, que para manter uma concentração de 25D<sub>3</sub> no sangue entre 20 a 50 ng/ml uma vaca em lactação deve ingerir pelo menos 20 000 UI de 25D<sub>3</sub> por dia (Nelson, Reinhardt, Lippolis, Sacco, & Nonnecke, 2012).

No rim a 25D<sub>3</sub> é hidrolisada pela enzima 1-α-hidroxilase (1α-OHase) no Carbono um ou pela 24-hidroxilase (24-OHase) no carbono 24 dando origem a 1,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> ou 24R,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub>. A concentração de 1,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (1,25D<sub>3</sub>) na corrente sanguínea está dependente da expressão no rim da enzima 1α-OHase. Aquelas enzimas são reguladas pela hormona da paratiróide (PTH), pelo factor de crescimento dos fibroblastos 23 (FGF23) e pela própria 1,25D<sub>3</sub>, com o



O rácio  $1\alpha$ -OHase:24-OHase é crítico no peri-parto da vaca. Quanto mais elevado for, mais facilmente a vaca aumenta as concentrações de  $1,25D_3$  e responde em caso de necessidade de Ca (Horst, Goff & Reinhardt, 2005).

### **1.3. Vitamina D e imunidade na vaca**

A forma  $1,25D_3$  funciona também como reguladora da imunidade inata e adaptativa nos bovinos. Nas vacas a  $1,25D_3$  têm a sua acção sobre as células imunitárias através de mecanismos de sinalização parácrina e intácrina (Nelson *et al.*, 2010; Nelson, Reinhardt, Beitz & Lippolis, 2010; Nelson *et al.*, 2011). Algumas experiências em ruminantes mostraram que o uso de vitamina  $D_3$  pode activar de forma intacrina a resposta pelas células imunitárias. Nesse sentido, Lippolis, Reinhardt, Sacco, Nonnecke, & Nelson (2011) demonstraram que é possível usar  $25D_3$  para melhorar as defesas imunitárias da vaca no combate a infecções bacterianas intramamárias.

Várias células imunitárias, nomeadamente macrófagos, neutrófilos, células apresentadoras de antigénios e linfócitos produzem a enzima  $1\alpha$ -OHase. A enzima  $1\alpha$ -OHase que se encontra nos macrófagos dos bovinos é estimulada pela activação dos receptores *toll-like*, que são activados quando reconhecem padrões moleculares típicos da constituição de microrganismos patogénicos como peptidoglicano, lipopolissacáridos e lipopéptidos de micobactérias. A conversão de  $25D_3$  em  $1,25D_3$  no citosol do macrófago vai então activar a resposta imunitária mediada pela vitamina D. Esta resposta faz-se essencialmente através da produção de espécies reactivas de oxigénio como o óxido nítrico e  $\beta$ -defensinas. Se o nível de  $25D_3$  for baixo esta resposta pode ficar comprometida (Nelson *et al.*, 2010a; Nelson *et al.*, 2010b). Adicionalmente, a sua principal acção nas células da resposta imunitária adaptativa parece ser a diminuição da secreção das citocinas pró-inflamatórias, interferão- $\gamma$  e isoleucina 17 (Waters *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2011).

### **1.4. Fisiologia do cálcio**

A concentração de Ca total na circulação sanguínea de uma vaca adulta é, fisiologicamente, mantida entre 8,0 mg/dl e 10,0 mg/dl (2,0 mmol/l e 2,5 mmol/l)\* (Mateus & Lopes da Costa, 2002). Cerca de 50% encontra-se ligado a proteínas, principalmente à albumina, e os restantes 42 a 48% encontra-se na forma ionizada ( $Ca_i$ ),

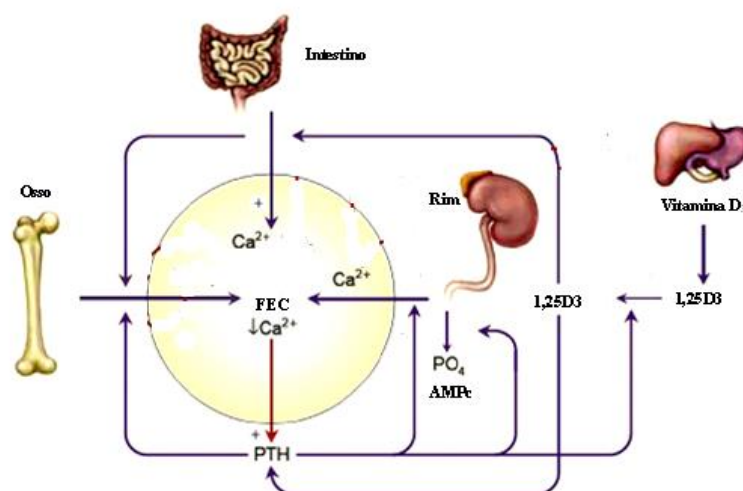
\*Conversão de mg/dl em mmol/l = x mg/dl\*0,25

a forma biologicamente activa. Em condições de ligeira acidemia a percentagem de  $Ca_i$  é cerca de 48%, enquanto que em condições de sangue ligeiramente alcalino essa percentagem diminui para cerca de 42%. Os restantes 3 a 7 % encontram-se complexados com aniões solúveis, tais como o fosfato, citrato, bicarbonato ou sulfato (Goff, 2014).

Uma vaca adulta com 600 kg de peso vivo (PV) armazena nos ossos 7,8 a 8,5 kg de Ca, no plasma 3,0 a 3,5 g, nos fluidos extracelulares 8 a 9 g e menos de 1 g no meio intracelular. Para a produção de 1 kg de colostro a vaca necessita de 1,7 a 2,3 g de Ca e na produção de 1 kg de leite cerca de 1,1 g de Ca. Para manter a normocalcemia 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 (Goff, 2014).

As alterações são tão marcadas na altura do parto e as exigências em Ca tão elevadas, que só 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. Nesse controlo, o papel principal é protagonizado principalmente pela PTH e pela 1,25D<sub>3</sub>, discutida anteriormente. Estas duas hormonas vão promover a reabsorção óssea, a absorção intestinal e a reabsorção renal de Ca (Figura 3) (Brown, 2013).

**Figura 3** - Ilustração esquemática dos sistemas que mantêm a homeostasia do Ca. Em resposta à hipocalcemia é segregada PTH para a corrente sanguínea pela glândula da paratiróide. No rim a PTH vai aumentar a reabsorção de Ca, aumenta a síntese de 1,25D<sub>3</sub> a partir de 25D<sub>3</sub> e aumenta a excreção de fosfato. A 1,25D<sub>3</sub> vai aumentar a absorção de Ca do TGI e em conjunto com a PTH vão aumentar a reabsorção de Ca no osso (Adaptado de Brown, 2013)

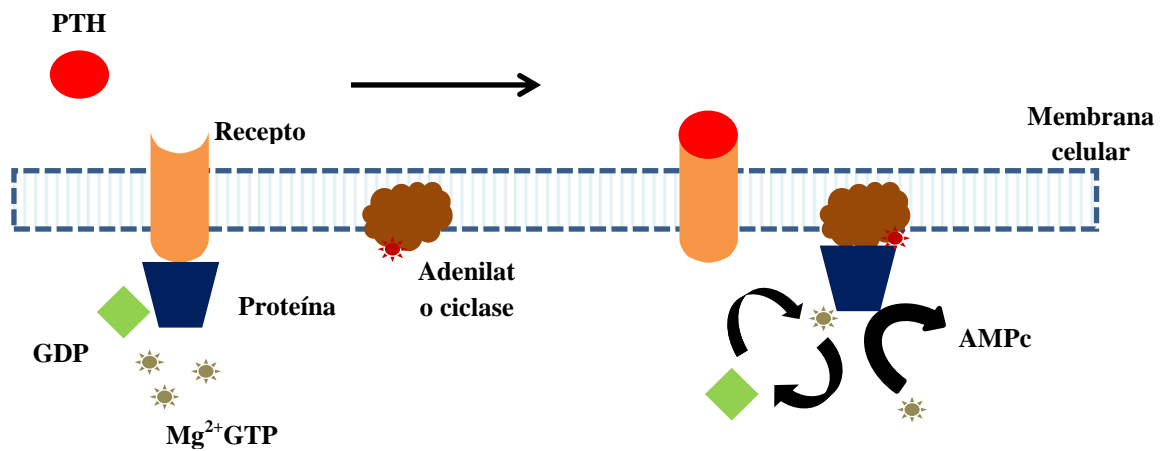


#### **1.4.1. Função da hormona da paratiróide na regulação do cálcio**

A homeostase do Ca é primariamente controlada pela glândula da paratiróide que responde à hipocalcémia sanguínea, aumentando a secreção de PTH pelas células principais. As células secretoras de PTH monitorizam a concentração de  $Ca_i$  através de receptores de Ca (CaSR) existentes na superfície das suas membranas plasmáticas, que possuem a capacidade de se ligar ao  $Ca_i$  e responder às suas flutuações. Em casos de normocalcémia estes receptores possuem os locais de ligação de Ca ocupados e a secreção de PTH é basal. Quando ocorre uma diminuição do  $Ca_i$  na corrente sanguínea, os sítios de Ca são libertados dos CaSR e a PTH é segregada para a corrente sanguínea em grande quantidade. Os CaSR regulam a concentração sanguínea de Ca controlando a função da glândula da paratiróide em várias funções, incluindo a secreção de PTH, controlo da transcrição do gene da PTH e divisão celular das células glândulares (Brown, 2013).

Uma vez na corrente sanguínea a PTH vai exercer a sua acção em três locais, uma acção rápida (no rim) e uma acção mais lenta (no intestino e osso). Nas células alvo (osteoblastos, osteocitos e células do epitélio tubular renal) a PTH vai ligar-se a um receptor constituído por uma proteína transmembranar que possui um domínio extracelular (local de ligação da PTH), um domínio transmembranar e um domínio intracelular. O domínio intracelular está ligado a uma proteína G no seu estado inactivo, e esta encontra-se ligada a uma guanosina difosfato (GDP). Quando a PTH se liga ao seu receptor extracelular provoca uma alteração conformacional na sua estrutura terciária que se propaga através do domínio transmembranar até ao domínio intracelular, onde as alterações na proteína G promovem a troca da GDP por uma  $Mg^{2+}$ -guanósina trifosfato. As alterações provocadas por esta troca provocam a dissociação da proteína G do receptor da PTH, que vai formar um complexo com uma adenilato ciclase adjacente. O complexo proteína G/adenilato ciclase vai catalisar a conversão de  $Mg^{2+}$  ATP em adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (Figura 4). O AMPc vai funcionar como segundo mensageiro activando proteínas cinases e outras vias de sinalização intracelular de forma a restaurar a concentração de Ca extracelular em níveis normais (Goff, 2014).

**Figura 4** - Acção da PTH nas células alvo (osteoblastos, osteocitos e células do epitélio tubular renal). (☼) Íão magnésio. (Adaptado de Goff 2014)



#### 1.4.2. Reabsorção renal do cálcio

No rim aproximadamente 45 % do Ca<sub>i</sub> plasmático é filtrado através do glomérulo e entra no túbulo contornado proximal (TCP). Cerca de 85% do cálcio filtrado é absorvido de forma passiva paracelular, de forma não regulada, através das junções apertadas entre as células dos túbulos renais, 65% no TCP e 20% no segmento fino ascendente da Ansa de Henle (Biner *et al.*, 2002; Loffing *et al.*, 2001; Reilly & Ellison, 2000). O restante, aproximadamente 15%, é reabsorvido de forma regulada tendo em conta as necessidades fisiológicas no túbulo contornado distal (TCD) e no túbulo colectador (TC) ( Costanzo *et al*, 2000 citado por Boros, Bindels, & Hoenderop, 2009).

A regulação da reabsorção de Ca<sub>i</sub> no rim vai ser exercida principalmente pela PTH, pela 1,25D<sub>3</sub> e por estrogénios. Receptores para a PTH encontram-se no TCD e no TC. O aumento da PTH no rim vai provocar um aumento da expressão das proteínas envolvidas no transporte do Ca e assim aumentar a sua reabsorção (Abel *et al.*, 2005).

No rim a 1,25D<sub>3</sub> no rim vai ter uma acção sinérgica com a PTH com e os estrogénios, que apesar de normalmente não serem considerados hormonas calcemiantes, existem provas que têm também algum efeito no aumento da expressão das proteínas de transporte do Ca (Boros *et al.*, 2009).

### 1.4.3. Absorção intestinal do cálcio

Para que o Ca atravesse o epitélio intestinal e entre na corrente sanguínea, como todos os outros minerais, é necessário que esteja na forma solúvel. Felizmente, o ácido do abomaso permite que grande parte do Ca da dieta seja solubilizado, uma vez que nas forragens o Ca está ligado a compostos orgânicos, oxalatos e lignina, constituindo estes uma forma indisponível para a absorção do TGI da vaca (Ward, Harbers, & Blaha, 1979; Goff, 2014).

Os locais de absorção gastrointestinal de Ca nos ruminantes ainda não estão bem definidos, existindo ainda algumas dúvidas. O epitélio ruminal absorve Ca *in vitro* mas *in vivo* tal não foi provado (Schröder, Rittmann, Pfeffer, & Breves, 1997; Mirja R. Wilkens, Kunert-Keil, Brinkmeier & Schröder, 2009). Apesar disso, independentemente da importância dos locais de absorção, pode admitir-se que o processo é idêntico aos animais monogástricos.

O transporte do Ca através do epitélio intestinal pode ser activo ou passivo. A absorção transcelular activa do Ca é uma via saturável e controlada hormonalmente. O transporte paracelular do Ca é uma via não saturável e de uma forma geral não regulada, apesar de poder apresentar regulação mínima através da modificação da permeabilidade epitelial (Pérez *et al.*, 2008).

O mecanismo de absorção transcelular de Ca envolve transporte activo através das células epiteliais intestinais no duodeno e jejuno, por um processo dependente da estimulação das células epiteliais pela 1,25D<sub>3</sub>. A primeira barreira é a passagem do Ca através da membrana apical dos enterócitos. Como a concentração intracelular de Ca é extremamente baixa, praticamente todas as dietas fornecem uma concentração de Ca suficiente para criar uma concentração luminal muito superior à concentração intracelular. Esta diferença de concentração seria suficiente para criar um gradiente electroquímico que promove a passagem de Ca do lúmen para o interior do enterócito. No entanto, isso não acontece porque a membrana celular apical não é permeável ao Ca. Para que o Ca entre para o interior do enterócito são necessárias proteínas (canais) permeáveis ao Ca e para que essas moléculas sejam expressas é necessária a intervenção da 1,25D<sub>3</sub> que se vai ligar aos factores de transcrição que controlam a expressão dos genes regulados pela vitamina D e promover a sua transcrição (Goff, 2014).

Para que o fluxo de Ca entre o lúmen intestinal e a corrente sanguínea se faça de forma unidirecional é necessário tamponar o  $Ca_i$  no citosol celular para mascarar a sua concentração e evitar a sua acção como mensageiro secundário intracelular. A quantidade de Ca livre no citosol é muito baixa e tal deve-se à acção de uma proteína ligante de Ca chamada de calbindina-D9k, cuja expressão genética também é controlada pela  $1,25D_3$  (Bronner, 2003; Hoenderop, Nilius, & Bindels, 2005). A calbindina-D9k liga o Ca livre no citosol e liberta-o junto à membrana celular basolateral onde este é captado por proteínas transportadoras de Ca dependentes de energia. Destes transportadores fazem parte o Ca - ATPase e o antiporte  $Na^+/Ca^{2+}$  que libertam o Ca na corrente sanguínea. A regulação destes transportadores é baixa, mas ainda assim é sensível ao controle pela  $1,25D_3$  (Hoenderop *et al.*, 2005).

A activação de todo este processo requer tempo. Sabe-se que os níveis de calbindina – D9k nas células epiteliais do duodeno aumenta 18 horas após o aumento da  $1,25D_3$  na corrente sanguínea e para que o transporte activo transcelular aumente significativamente o Ca no sistema vascular entérico, são necessárias cerca de 48 horas após a estimulação pela  $1,25D_3$  (Wasserman & Fullmer, 1995; Goff, Horst, Littledike, Boris, & Uskokovic, 1986).

Existe também um segundo sistema de absorção intestinal de Ca independente da vitamina D. Este mecanismo envolve a passagem de Ca do lúmen intestinal para a corrente sanguínea através das junções entre as células do epitélio intestinal. Este mecanismo, conhecido como transporte paracelular de Ca, promove a passagem de Ca de zonas de maior concentração no lúmen para zonas de menor concentração - a corrente sanguínea e o meio extracelular (Goff, 2014).

Nas vacas, especialmente na vaca peri-parturiente o contributo relativo da via transcelular e da via paracelular não é conhecido, mas sabe-se que o mecanismo dependente de vitamina D predomina em casos de dietas baixas em Ca, e que o mecanismo paracelular predomina em dietas ricas em Ca (Goff, 2014).

#### **1.4.4. Reabsorção óssea do cálcio**

O tecido ósseo representa a maior e mais importante reserva do ião Ca. A sua mobilização permite uma arma altamente eficaz e importante para o combate à



hipocalcémia. O Ca ósseo existe em duas formas, cuja mobilização é igualmente eficaz no aumento do Ca plasmático:

- cristais de hidroxiapatite ligadas a uma matriz de colagénio, que constitui mais de 99% do Ca, sendo necessário a intervenção dos osteoclastos para a sua mobilização. Os osteoclastos têm origem num precursor comum aos monócitos. No entanto, estas células não possuem receptores para a hormona PTH, sendo estes receptores encontrados apenas nos osteoblastos. O osteoblastos, que se encontram a delimitar todas as superfícies ósseas, ao serem estimulados pela PTH segregam citoquinas que promovem a reabsorção óssea pelos osteoclastos pre-existentes e estimulam a diferenciação de novos osteoclastos a partir das células progenitoras. Normalmente a activação completa deste sistema leva vários dias (Goff *et al.*, 1986; Hoorn & Zietse, 2013)

- em solução, rodeando os osteócitos das lacunas e dos canalículos ósseos. Esta reserva é muito menor mas importantíssima para uma rápida mobilização de Ca. Os osteócitos, quando estimulados pela PTH, levam apenas alguns minutos a mobilizar este Ca para o meio extracelular. A quantidade de Ca neste estado varia com o pH, quando a vaca se encontra num estado de alcalose metabólica é cerca de 9 g e em estado de acidose é cerca de 15 g ( Teti & Zallone, 2009; Goff, 2014).

Todas as vacas passam por uma ligeira osteoporose lactacional, que provoca a perda e 9 a 13% do Ca ósseo no primeiro mês de lactação, que é reversível nos meses seguintes (Goff, 2008).

### **1.5. Fisiologia do fósforo**

O fósforo é o segundo mineral mais abundante no osso. Este mineral é um componente essencial do sistema tampão ácido-base, é um componente dos fosfolípidos, das fosfoproteínas, dos ácidos nucleicos e das moléculas de ATP (Goff, 2006).

O fósforo é normalmente ingerido sob a forma de ácido fítico. Uma vez no rúmen, o fitato vai ser digerido pela microflora ruminal e libertar o fósforo. A absorção vai realizar-se no intestino delgado, por transporte activo modelado pela  $1,25D_3$ . A concentração plasmática de fósforo normal é de 1,3 – 2,6 mmol/l, sendo a fosfatémia directamente proporcional à quantidade de fósforo absorvida a nível intestinal (Goff, 2006).

A PTH tem um papel importante na manutenção dos níveis de fósforo no sangue. Quando a PTH é segregada em resposta à diminuição da calcémia e promove a mobilização de cálcio do osso, liberta também grandes quantidades de fósforo. Para evitar uma hiperfosfatémia a PTH estimula a sua excreção na saliva e a nível renal. Esta pode ser a razão por que animais com hipocalcémia estão também geralmente em estado de hipofosfatémia (Blaine, Chonchol, & Levi, 2014).

No entanto, o papel central no controlo dos níveis adequados de fósforo no organismo é desempenhado pelo FGF23. A sua síntese ocorre nos osteoblastos e osteócitos em resposta à hiperfosfatémia e níveis elevados de  $1,25D_3$ . Esta hormona vai promover a fosfatúria, vai inibir a  $1\alpha$ -OHase e assim diminuir a produção de  $1,25D_3$  e vai estimular a actividade da 24-OHase, levando à inactivação da  $1,25D_3$ . Vai também inibir a excreção de PTH a nível da hormona da paratiróide através da repressão da transcrição do gene da PTH e da inibição da secreção. Todas estas acções vão promover a diminuição da  $1,25D_3$  e indirectamente a absorção intestinal de fosfato, uma vez que esta é dependente de  $1,25D_3$  (Silver & Naveh-Many, 2012).

Para uma manutenção normal de fósforo extracelular é necessário que as perdas devido ao crescimento muscular, excreção fecal, perdas urinárias e produção de leite sejam repostas pela absorção intestinal e reabsorção óssea (Reinhardt, Horst, & Goff, 1988).

O crescimento do esqueleto fetal, na fase final da gestação, pode remover até cerca de 10g por dia de fósforo do *pool* materno. As glândulas salivares removem entre 30 e 90g diárias de fósforo do meio extracelular e o leite cerca de 1g de fósforo por kg de leite produzido (House & Bell, 1993; Goff, 2006).

A hipofosfatémia ocorre sobretudo no último terço da gestação, principalmente devido ao desenvolvimento fetal, nomeadamente em gestações gemelares, e devido à produção de colostro, ocorrendo paralelamente a situações de hipocalcémia. Os casos associados a hipocalcémia devem-se principalmente à excretora acção da PTH. As vacas com hipofosfatémia encontram-se em decúbito, mas estão alerta e comem se a comida lhe for colocada em zona acessível. A fosfatémia nestes animais é frequentemente inferior a 0,3 mmol/L. Concomitantemente a vaca geralmente apresenta hipocalcémia, hipermagnesiémia e em alguns casos hipoglicémia. O tratamento da hipocalcémia com soluções de Ca subcutâneo ou oral normalmente repõe rapidamente também os níveis de fósforo. Isso deve-se à diminuição da secreção de PTH que por sua vez vai diminuir a

excreção de fósforo. O Ca vai também restabelecer a motilidade instestinal e assim permitir uma eficaz absorção de fósforo da dieta e das secreções salivares (Goff, 2006).

### **1.6. Fisiologia do magnésio**

O magnésio (Mg) é o catião em maior abundância no meio intracelular actuando principalmente como co-factor enzimático vital para a maioria das vias metabólicas. O Mg extracelular é essencial para o funcionamento das células nervosas, para a contracção muscular e para a mineralização do osso (Goff, 2014).

Não existem mecanismos de regulação para manutenção da concentração corporal e sanguínea do Mg. Os níveis são quase exclusivamente dependentes da quantidade ingerida na dieta e absorvida pelo TGI. Para que a concentração se mantenha normal é necessário que a quantidade de Mg absorvida no TGI seja igual à quantidade excretada ou mantida indisponível (Mg absorvido para o meio intracelular, retenção no tecido ósseo, secreção endógena, crescimento fetal e produção de leite) (Goff, 2006).

A absorção do Mg ocorre maioritariamente no rúmen por transporte activo pela via transcelular. O transporte passivo paracelular, aparentemente é muito baixo e praticamente negligenciável (Brown, Care, & Pickard, 1978). Através de estudos *in vitro* e *in vivo* conclui-se que existem três mecanismos predominantes na absorção de Mg (Martín-Tereso & Martens, 2014):

- a) O primeiro através da força motriz exercida pela diferença de potencial da membrana celular apical. Este mecanismo é modelado pela concentração de potássio (K) no fluido ruminal.
- b) O segundo é um mecanismo de co-transporte em que o Mg é absorvido juntamente com um anião que neutraliza a sua carga. Este mecanismo não é sensível à concentração de K ruminal e o seu funcionamento depende da concentração de Mg no líquido ruminal.
- c) O terceiro mecanismo é um transporte activo desenvolvido por uma bomba de  $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$  dependente de energia.

Aparentemente os mecanismos de absorção não funcionam em simultâneo, o seu funcionamento depende da concentração de Mg no líquido ruminal. Foi proposto que os dois primeiros, os mais importantes, tenham acções complementares, quando a concentração de Mg é baixa o mecanismo sensível ao K tem uma alta afinidade e uma

baixa capacidade e vice-versa. Quando a concentração de Mg é elevada o mecanismo independente de K tem uma elevada capacidade e uma baixa afinidade e vice-versa (Ram, Schonewille, Martens, Van't Klooster, & Beynen, 1998).

O rim desempenha um papel muito importante na manutenção da normomagnesiémia (Littledike & Goff, 1987). Cerca de 70% do Mg sanguíneo é filtrado no nefrónio mas apenas 3% a 5% é excretado na urina. Para que isso ocorra foram já descritos três mecanismos de reabsorção:

- a) 20% a 30% é reabsorvido no túbulo proximal, provavelmente por transporte passivo, juntamente com a água (Martín-Tereso & Martens, 2014).
- b) A maior parte (60% - 70%) acontece no segmento fino ascendente da ansa de Henle por via paracelular e tendo como força motriz principal a diferença de potencial transepitelial (lúmen positivo). Esta via é comum à absorção de Ca e isso pode ajudar a explicar que comumente em vacas com hipocalcémia estas apresentem aumento da magnesiémia e uma sensibilidade aparente à PTH (Groenesteghe, Hoenderop, van den Heuvel, Knoers, & Bindels, 2006; Martinez *et al.*, 2014).
- c) O Mg restante é reabsorvido no tubulo colector por transporte activo (Martín-Tereso & Martens, 2014).

A magnesiémia normal de uma vaca encontra-se entre 1,9 e 2,4 mg/dl (0,80 e 1,0 mmol/l) (Mayland, 1998 citado em Goff, 2014). Quando a concentração de Mg no sangue desce abaixo de 1,2 mg/dl, a vaca normalmente desenvolve uma afecção designada por “tetania da erva”. Como a concentração de Mg está directamente dependente da absorção ruminal, é muito importante que a dieta possua uma concentração de Mg adequada e deve evitar-se também níveis elevados de K, principalmente no alimento das vacas secas (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2007).

### **1.6.1. Factores que afectam a absorção ruminal de magnésio**

Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram a importância da concentração de K na redução da absorção de Mg. Altas concentrações de K no fluido ruminal vão despolarizar a membrana apical e assim eliminar a diferença de potencial que é a força motriz de um

dos mais importantes mecanismos da absorção do Mg através do epitélio ruminal, como descrito anteriormente (Martín-Tereso & Martens, 2014).

O aumento rápido da concentração de amónia ( $\text{NH}_4^+$ ) no líquido ruminal compromete a absorção de Mg, alteração que desaparece após a adaptação do epitélio ruminal que leva 2 a 3 dias. Isto é particularmente importante quando se passa de uma dieta pobre em azoto para uma dieta rica em azoto, o que provoca um rápido aumento ruminal de  $\text{NH}_4^+$  e conseqüentemente diminui a absorção de Mg (Martens *et al.*, 1988 citado por Martín-Tereso & Martens, 2014).

Para controlar a suplementação de Mg a nível do efectivo, podemos recolher amostras de sangue de uma amostra de animais e medir o Mg. A colheita de sangue de vários animais 12 horas após o parto é uma forma simples e eficaz de monitorizar os níveis de Mg no período pós-parto, que constitui um período crítico. Se a concentração de Mg no soro não for igual ou superior a 2,0 mg/dl em 9 a 10 vacas, sugere níveis inadequados de absorção na dieta ou nutrientes que estão a interferir na absorção do Mg (Goff, 2014).

### **1.6.2. Hipomagnesiémia como factor de risco para hipocalcémia**

A hipomagnesiémia pode afectar o metabolismo do cálcio de duas formas, primeiro afectando a secreção de PTH pela glândula da paratiróide e em segundo lugar reduzindo a sensibilidade dos tecidos alvo para a PTH (Rude, 1998; Goff, 2006).

A interacção perfeita entre a PTH e o seu receptor é essencial na homeostase do Ca (Figura 4). Em situações de normomagnesiémia, a PTH ao ligar-se as células dos tecidos alvo, tecido renal e tecido ósseo, promove alterações conformacionais neste receptor que culminam com a activação de uma adenilato ciclase ou uma fosfolipase c, que por sua vez catalizam a síntese de AMPc e inositol, respectivamente. Estes mensageiros secundários vão promover alterações intracelulares e transcrição de genes com o objectivo de combater a hipocalcémia. Tanto a fosfolipase c como a adenilato ciclase possuem um local de ligação para um ião magnésio e para um funcionamento pleno dessas enzimas é necessário que estes locais de ligação se encontrem ocupados pelo ião. Em situações de hipomagnesiémia, muitas dessas enzimas não funcionam, ou funcionam de forma menos eficaz e a via de sinalização intracelular não se desencadeia

com a velocidade desejada, afectando negativamente a mobilização de Ca do osso e a síntese de  $1,25D_3$  (Rude, 1998).

### 1.6.3. Níveis ideais de magnésio no alimento

A quantidade adequada de Mg na dieta de uma vaca depende de vários parâmetros e da fonte de Mg usada. Tem que se ter em conta principalmente a biodisponibilidade do composto, a quantidade de K no alimento e IMS.

A quantidade de Mg nas dietas de vacas secas e em início de lactação deve ser entre 3,5 e 4,0 g/kg MS (Ram *et al.*, 1998).

Como a IMS está severamente reduzida no peri-parto, variando entre 6 e 10 kg dia, não só é importante fazer a sua monitorização, como esta deve entrar nos cálculos da quantidade de Mg a incluir na ração. Outro parametro importantíssimo e a ter em conta é a digestibilidade do magnésio.

**Tabela 1** - Quantidade de Mg a incluir na dieta tendo em conta a sua digestibilidade e a IMS (Adaptado de Martín-Tereso & Martens, 2014).

IMS (kg/d)	Mg (%IMS)	Ingestão Mg (g/d)	Necessidades Mg (g/d)	Digestibilidade necessária Mg (%)
6	0,3	18	6,4	36
8	0,3	24	6,4	27
10	0,3	30	6,4	21
6	0,4	24	6,4	27
8	0,4	32	6,4	20
10	0,4	40	6,4	16

Os compostos que apresentam melhor biodisponibilidade e palatabilidade são o óxido de Mg (MgO) e o hidróxido de Mg  $Mg(OH)_2$ . O óxido de Mg possui cerca de 54% a 56% de Mg e deve ser disponibilizado às vacas sob a forma de pó muito fino. Infelizmente, existe uma elevada variabilidade na biodisponibilidade do MgO, mas é possível fazer um teste rápido e barato que permite estimar a biodisponibilidade relativa do Mg. Colocar 3g de uma fonte de MgO num recipiente e juntar lentamente 40 ml de ácido acético (vinagre branco). Tapar o recipiente e agitar bem durante 15 segundos, deixar repousar e ao fim de 30 minutos medir o pH. O pH do vinagre é a volta de 2,6 a 2,8, as

melhores fontes de MgO vão elevar o pH acima de 8,2 e as piores à volta de 3,8 (Goff, 2014).

### **1.7. Fisiologia do potássio**

A concentração normal de potássio (K) extracelular e plasmático, numa vaca, encontra-se no intervalo de 3,9 – 5,8 mmol/L e tem um papel fundamental no equilíbrio osmótico e balanço ácido-base. O K intracelular, entre 150 – 160 mmol/L, funciona como co-factor enzimático de enzimas envolvidas na síntese proteica e no metabolismo dos carboidratos. Desempenha também um papel fundamental na manutenção da osmose intracelular e no equilíbrio ácido-base. O rácio entre o  $K_i/K_e$  é fundamental no estabelecimento do potencial de membrana e afecta a excitabilidade das células musculares e nervosas (Goff, 2006).

Praticamente todo o K corporal é absorvido no TGI, o que por si só, é uma prevenção à hipercalémia. O excesso de K é excretado a nível renal e regulado pela aldosterona, que aumenta a excreção do K em troca de iões sódio. As concentrações elevadas de K (hipercalémia) conseguem por si só estimular a secreção de aldosterona pelas glândulas adrenais, no entanto, a hiponatrémia e a hipovolémia são estimulantes ainda mais potentes para a secreção de aldosterona. A aldosterona aumenta também a secreção de K na saliva e nas secreções pancreáticas auxiliando o rim a evitar a hipercalémia. Após uma refeição o K entra rapidamente para o espaço extracelular, enquanto que o rim demora várias horas para excretar o excesso de K, como consequência, para evitar a hipercalémia, é necessário um mecanismo de actuação rápida que é desempenhado pela insulina quando os níveis de K aumentam no sangue é estimulada a secreção de insulina (o mesmo acontece em resposta à hiperglicémia), que vai estimular o funcionamento da bomba de Na/K, particularmente no fígado e no tecido muscular, que promovendo a entrada de K para o espaço intracelular e assim normalizar a calémia. Outra hormona capaz de diminuir a calémia, é a adrenalina, que serve provavelmente para proteger o animal de hipercalémia durante ou após o exercício físico. Durante o exercício o K é libertado pelas células musculares durante os ciclos de excitação – contracção, sendo que a estimulação dos receptores  $\beta_2$  das catecolaminas aumenta o funcionamento da bomba Na/K e leva a uma redução da concentração de K no espaço extracelular, devido à entrada deste para o interior das células musculares e hepáticas (Goff, 2006).

Quando a concentração do hidrogênio ( $H^+$ ) começa a aumentar no sangue, o K abandona o fluido intracelular (FIC) e passa para o fluido extracelular (FEC). Ao mesmo tempo o  $H^+$  passa para o FIC, entrando o animal em hipercalémia em resposta à acidose. Ao contrário, se o animal está em risco de desenvolver alcalose, o K sai do FEC e entra no FIC, causando hipocalémia, em resposta o  $H^+$  intracelular sai para o espaço extracelular e o pH volta a valores normais (Goff, 2006).

Os níveis de K na dieta são normalmente mais do que suficientes para suprimir as necessidades de uma vaca, assim se o animal se mantiver a comer, facilmente evita carências de K. No entanto, em casos de anorexia (e.g. indigestão, cetose, peri-parto) rapidamente se pode instalar um estado de hipocalémia.

### **1.7.1. Balanço corporal de potássio na vaca**

Como o K é um ião que se encontra sobretudo no FIC, a determinação da concentração de K no plasma é um indicador muito pouco fiável do estado calémico do animal. Um método bastante fiável é a determinação do K intracelular nos eritrócitos e nas células musculares mas com os métodos actuais isto é pouco exequível (Sattler, Fecteau, Couture, & Tremblay, 2001).

Uma vaca com 600 kg vai ter aproximadamente 1150 g de K no FIC, 23 g de K no FEC e 7 g no plasma sanguíneo. As necessidades de manutenção devem-se à quantidade de K perdido na urina (aproximadamente 0,038 g K/kg de peso corporal em dietas com deficiência em K) e nas fezes (aproximadamente 6,1 g de K perdido por kg de MS ingerida). O leite contém cerca de 1,5 g de K/kg e o desenvolvimento fetal, no último terço de gestação, requer aproximadamente 1 g K/dia (Goff, 2006).

### **1.7.2. Factores de risco para hipocalémia associados ao potássio**

Vacas em lactação com menos de 60 dias pós-parto estão em risco de entrar em hipocalémia devido sobretudo a doenças que provoquem anorexia. Uma possível via é através da administração repetida de glucocorticóides com actividade mineralcorticóide que vai aumentar a excreção de K pelo rim, podendo ter como consequência o desenvolvimento de hipocalémia. Tratamentos múltiplos com dextrose e insulina também já foram associados a níveis bastante baixos de K. O K vai ter principalmente



duas ações negativas que predisõem para a hipocalcémia: 1) interfere com a absorção ruminal de Mg como descrito anteriormente; 2) é um ião com alguma actividade alcalinizante do sangue (Peek, Divers, Guard, Rath, & Rebhun, 2000).

Assim, dietas compostas por alimento rico em K (luzerna, por exemplo) no pré e pós-parto estão normalmente associadas a um aumento do risco de hipocalcémia clínica. Alguns investigadores advogam mesmo que se fosse possível produzir forragens ou dietas pobres em K para vacas leiteira seria suficiente para prevenir as hipocalcémias, permitindo mesmo substituir as dietas aniónicas (Goff & Horst, 1997).

## **1.8. Hipocalcémia**

A hipocalcémia em vacas leiteiras é de extrema relevância para uma exploração pelas implicações económicas e sobre o bem-estar animal.

Para a produção de colostro, nos últimos dias de gestação, e para o início da lactação a vaca necessita de se adaptar e de mobilizar rapidamente energia e nutrientes, incluindo minerais como o cálcio, não só para garantir a síntese do leite, mas também para a sua própria manutenção.

A calcémia normal de uma vaca situa-se no intervalo de 8 – 10 mg/dl, sendo que valores entre 5 – 8 mg/dl constituem uma hipocalcémia subclínica e valores abaixo de 5 mg/dl geralmente fazem com que o animal apresente sinais clínicos (Mateus & Lopes da Costa, 2002).

A incidência de hipocalcémia clínica em vacarias de leite comerciais é geralmente à volta de 5 – 7%. Estudos desde 1977 até 2009 obtiveram incidências de 3,45% (intervalo 0-7%) na América do Norte, 6,17% (intervalo 0-10%) na Europa e 3,5 % (intervalo 0-7%) na Austrália (DeGaris & Lean, 2008; Goff, 2008).

A incidência de hipocalcémia subclínica aumenta proporcionalmente com o número de lactações da vaca, ou seja, com a sua idade. Reinhardt, Lippolis, McCluskey, Goff & Horst (2011) analisaram as calcémias de várias explorações nos EUA obtiveram uma incidência de 25%, 41%, 49%, 51%, 54% e 42% da 1ª lactação-6ª lactação, respectivamente. Koch (2013) obteve sensivelmente os mesmos valores em Portugal, curiosamente numa das explorações onde ocorreu o nosso estudo.

A hipocalcémia clínica e a hipocalcémia subclínica são factores de risco para inúmeras doenças do periparto como retenção placentária, cetose, deslocamento do abomaso e

mastite. Estas doenças têm também um papel importante nas doenças reprodutivas, que leva ao aumento do intervalo entre partos, sendo muitas vezes razão para refugo do animal (Stevenson & Call, 1988). As vacas afectadas pela doença produzem menos leite nas primeiras 4 a 6 semanas pós-parto (Rajala-Schultz, Gröhn, & McCulloch, 1999). A hereditariabilidade da hipocalcémia é um tema controverso mas os trabalhos reportados encontraram valores muito baixos (DeGaris & Lean, 2008).

### **1.8.1. Fisiopatologia da hipocalcémia**

A hipocalcémia ocorre quando a excreção de cálcio pela glândula mamária como constituinte do colostro e leite, excede a quantidade absorvida pelo TGI e mobilizada do osso. A concentração de cálcio na corrente sanguínea atinge o seu mínimo geralmente entre as 12 e as 24 horas pós-parto e recupera, normalmente, por volta de dois a três dias após o parto.

Nos últimos dias de gestação e nos primeiros dias de lactação as necessidades de Ca são tão elevadas (podem exceder as 50g por dia) que só um funcionamento endócrino muito eficiente consegue evitar níveis muito baixos de Ca. No entanto, muitas vacas acabam por passar por um grau mais ou menos elevado de hipocalcémia nas primeiras 12 a 24 horas pós-parto, sem apresentar quaisquer sinais clínicos.

Quando a concentração de Ca baixa na corrente sanguínea a glândula paratiróide começa a segregar quantidades elevadas de PTH. Esta hormona uma vez em circulação, vai promover o aumento da forma activa da vitamina D e através da reabsorção óssea e renal de Ca e da absorção intestinal vai repor a normocalcémia (Radostitis *et al.*, 2007). Apesar das exigências em cálcio das vacas leiteiras altas produtoras, sempre se pensou que os mecanismos endócrinos fossem suficientes para restabelecer a calcémia em quaisquer circunstâncias. Então começou a pensar-se qual seria o problema, nesse sentido inicialmente pensou-se que glândulas da paratiróide falhassem no reconhecimento da hipocalcémia, teoria abandonada uma vez que mais tarde se descobriu que as vacas tinham altas concentrações de PTH (Capen & Young, 1967 citado por Goff, 2014). Martig & Mayer (1973) administraram PTH a vacas no pós-parto e contrariamente a vacas mais avançadas na lactação não havia aumento da calcémia. Goff, Reinhardt, & Horst (1989) avaliaram as hormonas envolvidas no metabolismo do Ca em vacas com hipocalcémias recorrentes e descobriram que estas

vacas possuíam elevados níveis de PTH mas baixos níveis de 1,25D<sub>3</sub>, chegando à conclusão que a PTH não estava a desempenhar o seu papel na activação da vitamina D a nível renal. Estes dois estudos foram fundamentais para perceber que no periparto os tecidos passam por um estado refractário à PTH. Vários estudos mais tarde identificaram alguns factores que interferem na homeostasia do Ca:

- a) O eixo PTH - 1,25D<sub>3</sub> leva 2 a 3 dias a estar totalmente funcional.
- b) A hipocalcémia diminui a motilidade do TGI e conseqüentemente a absorção de Ca.
- c) Para que a 1,25D<sub>3</sub> funcione são necessárias concentrações adequadas de Ca na dieta.
- d) A hipomagnesiémia torna a acção da PTH muito menos eficiente, assim como uma ligeira alcalose sanguínea.
- e) Com o aumento da idade a fracção de Ca óssea mobilizável diminui.

A isto tudo temos ainda que juntar a diminuição da IMS que se verifica no periparto e que também vai contribuir para a diminuição da ingestão e absorção de Ca.

### **1.8.2. Sinais clínicos da hipocalcémia**

A evolução da hipoalcémia clínica pode dividir-se em três fases:

Fase I – Discreta tetania, hiperexcitabilidade e hipertermia. Esta fase passa muitas vezes despercebida.

Fase II – Hipotermia (apesar de não ser um parâmetro facilmente mensurável pois depende muito da temperatura ambiente), taquicardia e fraqueza muscular com relutância em se levantar.

Fase III – Decúbito, primeiro esternal e depois costal. Ausência de reflexo pupilar e anal. Atonia ruminal, ausência de micção e defecação. O timpanismo vai-se agravando (pode ser a causa da morte). Depressão e letargia progressiva, seguida de coma e morte ao fim de algumas horas, a morte geralmente ocorre por insuficiência respiratória.

A hipocalcémia subclínica caracteriza-se por sinais subtis e inespecíficos – baixa produção, inapetência, hipotonia ruminal, fezes escassas, taquicárdia, inapetência e fraqueza muscular (Radostitis *et al.*, 2007).

### **1.8.3. Tratamento da hipocalcemia clínica**

O tratamento da hipocalcemia clínica passa pela administração de soluções de Ca (e.g. borogluconato) por via endovenosa lenta (50 ml/min). Na maioria das situações são suficientes cerca de 500 ml de uma solução a 24% (equivalente a cerca de 1ml/kg P.V.), podendo esta dose ser repetida algum tempo depois tendo em conta os sinais clínicos. Deve-se manter uma monitorização cuidada do sistema cardiovascular e parar a administração em casos de arritmias ou bradicardias prolongadas. Os sinais de recuperação durante a administração do Ca são: bradicardia, sudorese, tremores do pâncreo muscular, eructação, micção, aumento progressivo da resposta a estímulos e retorno dos reflexos (Radostitis *et al.* 2007).

## **1.9. Factores de risco para o desenvolvimento de hipocalcemia.**

### **1.9.1. Idade da vaca**

A incidência da hipocalcemia clínica está directamente relacionada com a idade. Vacas primíparas raramente têm febre do leite e em vacas de segunda lactação também é pouco normal, apesar destas por vezes já apresentarem uma incidência de hipocalcémias sub-clínicas apreciável. A incidência de hipocalcémias clínicas aumenta substancialmente a partir da terceira lactação. Existem pelo menos duas razões relativamente bem estudadas para esta diferença. Uma é que a mineralização óssea vai aumentando à medida que a vaca envelhece, diminuindo os locais activos de remodelação óssea, e com isso diminui a fracção de Ca ósseo disponível para mobilização em casos de hipocalcemia. Mas mesmo que esses locais sejam suficientes, existem menos osteoclastos para serem estimulados pela PTH, o que é o mesmo que dizer que o volume de citocinas que estes vão sintetizar é menor, o que vai levar mais tempo a recrutar e diferenciar células precursoras (monócitos) de osteoclastos. Este atraso pode ser suficiente para que se instale a hipocalcemia (Goff, 2014).

Por outro lado, à medida que a vaca envelhece o número de receptores de  $1,25D_3$  no intestino e no osso diminuem, pelo que a quantidade de Ca absorvida e reabsorvida, respectivamente, também diminui. Sabe-se ainda que o número de receptores da PTH

no rim, importantes para a activação do calcitriol também diminuem com a idade (Horst, Goff, & Reinhardt, 1990).

É possível que ainda existam mais alterações ligadas à idade que comprometam a homeostasia do Ca, como a diminuição de receptores da PTH nos osteoblastos e nos osteócitos, mas só as supracitadas são suficientes para atrasarem de forma irreversível a mobilização de Ca (Goff, 2014).

### **1.9.2. Predisposição de raça**

Ainda não se sabe muito da contribuição da raça para a incidência da hipocalcémia e muito menos se sabe para as vacas de *Crossbreeding* mas sabe-se que as vacas Jersey têm uma incidência de hipocalcémia bastante mais elevada do que as Holstein. E uma diferença, embora menos significativa, também existe nas Vermelhas Sueca e na Branca e Vermelha Norueguesa em relação à *Holstein-frísia* (HF). Inicialmente, pensou-se que a maior concentração de Ca no colostro das Jersey explicasse a sua maior predisposição, mas quando comparada a produção volúmica entre as duas percebe-se que a diferença entre a quantidade de Ca é relativamente baixa, ainda que possa ter alguma influência (Goff, 2014). Goff, Reinhardt & Horst (1995) observaram, apesar de existir um desvio padrão elevado, que as vacas Jersey possuem cerca de 15% menos receptores para a  $1,25D_3$ , do que as vacas HF.

### **1.9.3. Condição corporal**

A avaliação da condição corporal (CC) das vacas é muito importante, nomeadamente na altura do parto. Uma CC elevada predispõe a vaca para cetose e para fígado gordo. O excesso de peso predispõe também para hipocalcémia sendo que os factores não são ainda bem claros, mas pensa-se que estará relacionado com a diminuição da IMS, que reduz também a absorção de Ca e Mg. Além disso, sabe-se que vacas com condição corporal excessiva produzem leite com maior concentração de Ca. Finalmente, estudos em humanos com excesso de peso e fígado gordo demonstraram que estes apresentavam níveis séricos de  $25D_3$  muito baixos, o que é bem possível que aconteça nas vacas com excesso de peso, pois vacas leiteiras altas produtoras apresentam comumente algum grau de fígado gordo (Mulligan, OGrady, Rice & Doherty, 2006).

## **1.10. Prevenção da hipocalcémia**

### **1.10.1. Dietas aniónicas**

As dietas aniónicas provocam um estado de ligeira acidose no animal melhorando significativamente o metabolismo do Ca. Este método foi estudado e desenvolvido por Ender *et al* (1971) e Dishington (1975) (citados por Goff, 2014) e consiste na redução da diferença catiões-aniões na dieta das vacas (DCAD). Estes investigadores descobriram que dietas com elevadas concentrações de potássio (K) e baixas concentrações de cloro (Cl) e enxofre (S) aumentavam a incidência de hipocalcémia. Por outro lado, dietas com alto teor de Cl e S e baixo de Na e K ou dietas às quais foi adicionado sais aniónicos (SA) diminuíam a incidência de hipocalcémia.

O modo de acção dos aniões ainda não é conhecido, mas existem teorias com alguma consistência. Os iões absorvidos na dieta contribuem para as características eléctricas do sangue e dos fluídos corporais. A electroneutralidade sanguínea é mantida principalmente através das flutuações na concentração de hidrogeniões, o que provoca também alterações no pH. Se aumentar a concentração de catiões na corrente sanguínea, o sangue vai libertar hidrogeniões, para manter a electroneutralidade e o pH sanguíneo aumenta. Se por outro lado, aumentar a concentração de aniões na corrente sanguínea, como acontece quando se suplementa a dieta das vacas com SA, o excesso de cargas negativas não só mantém os hidrogeniões na corrente sanguínea, como promove a sua mobilização e assim o animal entra num estado de ligeira acidose. O osso constitui a maior fonte de substâncias tampão do organismo, assim em condições de acidose, a actividade osteolítica vai aumentar, aumentando também o *pool* de Cai em solução no osso, este Cai vai trocar com os hidrogeniões da corrente sanguínea para restabelecer o pH, no entanto devido à constante disponibilidade de aniões em excesso na dieta, o pH só vai regularizar quando a dieta for alterada (Goff & Horst, 2003).

A perda de cálcio na urina aumenta gerando um estado de constante hiper calciúria no animal e provocando um défice de Cai. Esta perda constante de Ca na urina vai aumentar a absorção de Ca intestinal e a mobilização de Ca do osso. Inicialmente pensou-se que este constante estado de hiper calciúria fosse o único responsável pela activação dos mecanismos de reposição da calcémia. No entanto, sabe-se hoje que em

condições de acidose a proteína *transient receptor potential vanilloid type 5* responsável pela reabsorção de cálcio, funciona apenas a 50% das suas capacidades em condições de acidose, isto pode explicar a calciúria e o aumento da absorção de Ca do TGI (Suzuki, Landowski & Hediger, 2008). Sabe-se também que o receptor da PTH é sensível ao pH, assim em condições de alcalose, alterações estruturais vão provocar uma diminuição da ligação da hormona. Por outro lado, condições de acidose parecem aumentar a resposta do receptor. Isto foi demonstrado por Goff *et al* (2014) através da alimentação de dois grupos de vacas, umas com uma alta diferença catiões-aníons (condições de alcalose) e o outro com uma baixa diferença (condições de acidose). De seguida, administraram PTH exógena e posteriormente mediram a calcémia e o calcitriol. Verificaram que o grupo alimentado com alto DCAD tinha baixos níveis de calcitriol e Ca na corrente sanguínea, já o grupo alimentado com um baixo DCAD tinha níveis elevados de calcitriol e uma normocalcémia.

Em resumo, pode-se dizer que alimentar as vacas no período seco com dietas aniónicas vai provocar o mesmo efeito quando se alimentam com dietas pobres em Ca. Ambas criam um défice de Ca que activa os mecanismos de restabelecimento da normocalcémia, com a vantagem das dietas aniónicas criarem as condições ideais de pH para uma rápida mobilização de Ca (Martín-Tereso & Verstegen, 2011).

### **1.10.2. Monitorização do efeito das dietas aniónicas**

As dietas aniónicas devem ser disponibilizadas 2 a 3 semanas antes do parto. Para monitorização da quantidade adequada de SA na dieta, usa-se o pH urinário. Para uma prevenção eficiente da hipocalcémia subclínica em vacas HF o pH deve estar no intervalo 6,2 – 6,8. Se a urina da vaca tiver um pH entre 5,0 a 5,5 é sinal de excesso de aniões o que pode conduzir a uma acidose descompensada com uma redução acentuada da IMS. A monitorização do pH urinário deve ser iniciado 72 horas após a alteração da dieta (os valores mais de acordo com o estado ácido-base são obtidos 6 a 9 horas após a disponibilização de alimento fresco à vaca) e se a dieta aniónica for disponibilizada durante mais de 3 semanas, apesar de continuar a fazer efeito, o pH pode aumentar 0,5 a 0,75 unidades (Goff, 2014).

### **1.10.3. Administração cálcio sub-cutanea**

A administração subcutânea de sais de Ca é um tratamento efectivo, mas como as vacas com hipocalcémia subclínica possuem algum nível de vasoconstrição periférica, a absorção da solução de Ca pode estar comprometida. A quantidade de Ca administrada em cada local deve ser entre 1 – 1,5 g (50 – 75 ml das preparações comerciais), sendo normalmente administrada a cada vaca cerca de 250 ml em quatro locais diferentes pois o Ca é irritante para os tecidos e pode provocar necrose local se forem administradas quantidades elevadas (Goff, 2008). Apesar da absorção subcutânea de Ca ser lenta, o aumento da concentração de Ca no plasma sanguíneo pode, por feedback negativo, provocar algum grau de inibição dos mecanismos endócrinos de mobilização de Ca e a hipocalcémia ocorrer dias mais tarde (Radostitis *et al.*, 2007).

### **1.10.4. Dieta pobre em cálcio**

Quando as vacas são alimentadas com uma dieta pobre em Ca (<20 g/d) no período seco, encontram-se normalmente em balanço de Ca negativo (Thilising-Hansen, Jørgensen & Østergaard, 2002). A baixa concentração de Ca na corrente sanguínea vai promover a secreção de PTH pela paratiróide e esta hormona vai promover a actividade dos osteoclastos e a síntese de  $1,25D_3$  pelo rim. A absorção de Ca pelo TGI aumenta, a mobilização óssea de Ca também e a normocalcémia é novamente reposta. Com a alimentação continua pobre em Ca, estes mecanismos vão manter-se activos e assim quando as necessidades de Ca para síntese de colostro e de leite aumentarem, essas necessidades vão mais facilmente ser colmatadas uma vez que os mecanismos de mobilização de Ca já estão activos (Goings, Jacobson, Beitz, Littledike & Wiggers, 1974; Green, Horst, Beitz & Littledike, 1981).

Segundo o NRC de 2000 as necessidades de Ca na fase final de gestação são de 14 g/d para a raça Jersey e 22 g/d para as vacas Holstein. Para que uma vaca de 600 kg com um consumo de 13 kg de MS seja deficitária em Ca, deve ser alimentada com uma dieta que lhe forneça cerca de 1,5 g de Ca absorvível/kg MS, ou seja, uma quantidade que lhe vai fornecer menos de 20 g/Ca por dia. Outra forma de alimentar a vaca com uma dieta pobre em Ca, é colocar as vacas no período seco em pastagens de gramíneas. A ingestão



de MS é muito inferior (6 a 7 kg MS/d) quando as vacas se alimentam de erva, sendo que as pastagens verdes normalmente têm cerca de 4 g Ca/kg MS, o que faz com que a vaca ingira menos de 28 g de Ca/d e só cerca de 9 – 10 g de Ca absorvível por dia.

Em resumo, as dietas pobres em Ca podem ser um método muito interessante e eficaz, mas apenas se se garantir que seja fornecida uma dieta rica em Ca poucos dias antes do parto e no pós-parto (Goff, 2014).

#### **1.10.5. Administração cálcio oral**

A administração de soluções orais de Ca no periparto constitui uma forma de prevenção, mas na verdade deve ser considerado um tratamento. Têm sido usadas soluções de cloreto de Ca mas estas podem ser cáusticas e grandes quantidades podem provocar uma acidose descompensada no animal, nomeadamente se associada a dietas aniónicas (Goff & Horst, 1993). O propionato de Ca é uma boa alternativa, pois não é cáustico para os tecidos, não é acidogénico e possui um precursor da glucose (propionato) que pode ser importante para prevenir algum grau de cetose que a vaca possa vir a ter (Goff & Horst, 1993; Pehrson, Svensson & Jonsson, 1998).

As soluções podem ser administradas através de intubação ou administrar em soluções palatáveis sendo por isso uma forma de administração mais ou menos laboriosa. Os programas preventivos mais estudados preconizam a administração de 3 a 4 doses no período de 12 a 24 horas antes do parto até 24 horas pós-parto (Goff, Horst, Jardon, Borelli & Wedam, 1996; Oetzel, 1996). No entanto, conseguiu bons resultados administrando 50 a 90 g por dose, uma imediatamente ao parto e outra 24 horas depois (Goff, 2006).

A administração de quantidades elevadas de Ca vai elevar significativamente a concentração deste ião no intestino e assim permitir um aumento da absorção paracelular de Ca (difusão de zona de mais alta concentração para uma de menor concentração). Esta via vai ser um auxílio precioso para a manutenção da normocalcémia numa altura de grandes necessidades e em que a absorção mediada pelo calcitriol, mesmo que em pleno funcionamento, não seja suficiente (Martín-Tereso & Martens, 2014).

As vantagens em relação às soluções endovenosas são, em primeiro lugar, que o efeito de inibição por feedback negativo vai ser inexistente ou quase nulo. Para isso vão

contribuir vários factores, primeiro a passagem da ingesta (com a solução de Ca) do rúmen para os outros compartimentos gástricos faz-se lentamente e assim permite uma chegada ao intestino, zona de absorção, lenta e contínua. Em segundo lugar, a absorção passiva de moléculas ou minerais é lenta e contínua e finalmente, nas condições ácido-base do rúmen a solubilidade do Ca vai ser muito baixa, o que vai diminuir a sua absorção passiva nos compartimentos pré-gástricos (Martín-Tereso & Martens, 2014). Se o pH ruminal for um pouco elevado ou a concentração em carbonatos for alta os iões de Ca vão precipitar e torná-los indisponíveis para a absorção. Nestes casos, devem melhorar-se as condições de pH ruminal através da manipulação da dieta ou procurar outras soluções de Ca menos susceptíveis a estas alterações (Martín-Tereso & Martens, 2014).

#### **1.10.6. Administração intramuscular de vitamina D**

A suplementação oral ou parentérica de análogos de vitamina D<sub>3</sub> têm sido muito estudados ao longo das últimas décadas com resultados ambíguos, mas são usados ainda hoje em algumas explorações para a prevenção de hipocalcémia clínica e sub-clínica.

Um das práticas é suplementar a dieta da vaca, no período seco, com 20 000 a 30 000 UI de vitamina D<sub>3</sub> por dia. Ao ser ingerida, a vitamina D<sub>3</sub>, entra na corrente sanguínea e é hidroxilada no fígado, passando a manter-se no sangue na forma 25D<sub>3</sub> em concentrações de 30 a 50 ng/ml prontas a servir de substrato da enzima  $\alpha$ -1-hidroxilase renal para a síntese de 1,25D<sub>3</sub>. Outra prática é injectar parentericamente doses altas de vitamina 25D<sub>3</sub> (10 000 000 UI ou mais) 10 a 12 dias antes do parto (Hibbs & Conrad, 1976). Nestas condições, a concentração de vitamina 25D<sub>3</sub> torna-se tão elevada que começa a ligar-se e a activar o RVD tal qual a forma activa 1,25D<sub>3</sub>. Esta acção promove o aumento da absorção do Ca a nível intestinal e assim previne a hipocalcémia. Infelizmente estas doses são muito próximas do limiar a partir do qual começa a haver toxicidade pelo Ca na forma de calcificação metastásica dos tecidos moles (Capen, Cole & Hibbs, 1966). Quando se tentaram doses mais baixas (500 000 a 1 000 000 de UI) aumentou a incidência da hipocalcémia devido ao efeito inibitório que altas concentrações de vitamina 25D<sub>3</sub> têm na secreção de PTH (Littledike & Horst, 1976 citado por Goff, 2014). Níveis baixos de PTH vão diminuir a concentração de 1,25D<sub>3</sub> pois esta hormona estimula a sua síntese a nível renal. Nestes animais a hipocalcémia

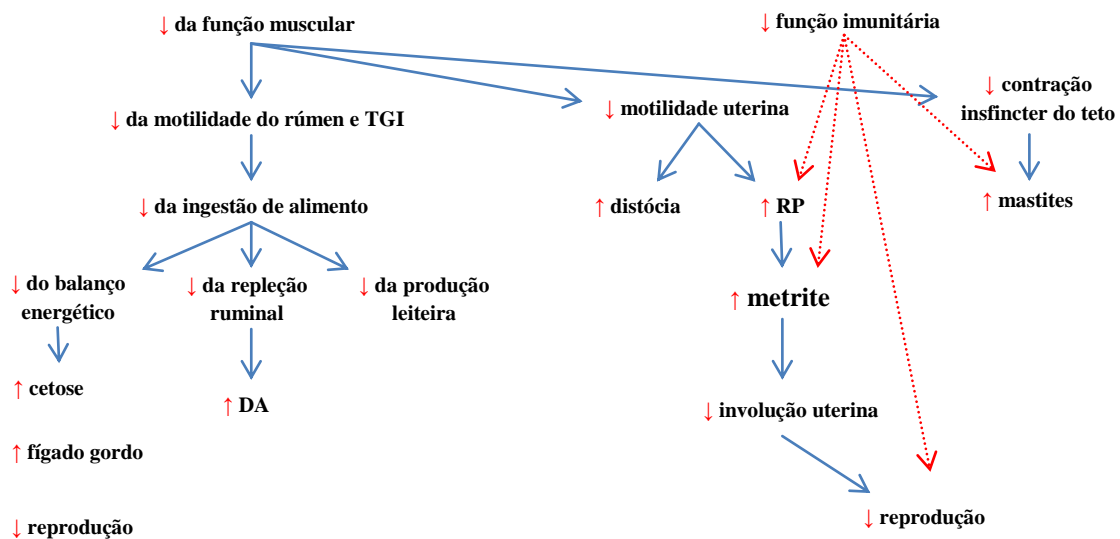
aparece quando a fonte exógena de vitamina D deixa de existir e a hipocalcemia clínica acaba por ocorrer 7 a 12 dias após o parto (Allsop & Pauli, 1985).

A prevenção com 1,25D<sub>3</sub> e os seus análogos pode ser uma medida bastante eficaz, no entanto continua a haver problemas da altura ideal para ser administrada à vaca uma vez que o parto não é fácil de prever com rigor (Bar, Perlman, & Sachs, 1985). O problema da supressão da síntese renal de 1,25D<sub>3</sub> pode ser evitado administrando o fármaco de forma contínua ao animal no periparto (Horst *et al.*, 1990).

### 1.11. Doenças associadas à hipocalcemia

O Ca é um mineral importantíssimo para várias funções no organismo e dessas funções existem três que quando os níveis de Ca são baixos ficam seriamente comprometidas. São elas a contração muscular lisa, a contração do músculo estriado e a função imunitária, que quando comprometidas podem ter efeitos gravíssimos para o animal. (Figura 5).

**Figura 5** - Consequências da Febre do Leite e hipocalcemia subclínica. ↓ - Diminuição da incidência, ↑ - Aumento da incidência, RP- Retenção placentária, DA – Deslocamento do abomaso, TGI – Tracto gastrointestinal. (Esquema adaptado de Mulligan *et al.*, 2006).



#### 1.11.1. Distócia e retenção placentária

Quando a concentração de  $Ca_{total}$  no sangue desce do limiar das 8 mg/dl e a vaca começa a entrar em hipocalcemia sub-clínica pela altura do parto o decurso normal deste pode sofrer algumas alterações. As contrações da musculatura lisa e estriada diminuem de intensidade e pode ocorrer atonias uterinas, inércia uterina e RP. Vários estudos indicam que vacas com hipocalcemia têm 6 vezes mais probabilidade de sofrer distócia do que vacas com calcemia normal, outros estudos reportaram um aumento de 2,5 a 3 vezes em relação a vacas saudáveis (Correa, Erb & Scarlett, 1993; Erb *et al.*, 1985).

Risco *et al* (1984) ao analisar soro de vacas com prolapso uterino demonstrou que estas tinham níveis de  $Ca_{total}$  mais baixos do que vacas saudáveis. Em outros trabalhos cerca de 19% das vacas com prolapso uterino tinham uma concentração de  $Ca_{total}$  no sangue inferior a 4 mg/dl e 28% tinham uma calcemia de 4 – 6 mg/dl (Mulligan *et al.*, 2006).

Vários estudos em vacas com retenção placentária chegaram à conclusão que vacas que sofreram hipocalcemia têm três vezes maior probabilidade de sofrer RP do que vacas com calcemia normal (Houe *et al.* 2001 citado por Mulligan *et al.*, 2006). Além da hipocalcemia por si só ser um factor de risco para RP, predispõe para distócia que por sua vez é um factor de risco para RP (Correa *et al.*, 1993).

### **1.11.2. Deslocamento do abomaso, cetose e fígado gordo**

A hipocalcemia clínica e sub-clínica provoca uma diminuição na motilidade ruminal e abomasal (Daniel, 1983). A diminuição da motilidade dos compartimentos gástricos vai provocar uma diminuição da IMS pelo animal, numa altura que se pretende precisamente o contrário, devido às suas crescentes necessidades metabólicas e nutricionais. Isto vai agravar o balanço energético negativo, que normalmente se verifica nesta altura, promover um aumento da mobilização das reservas de gordura, o que vai predispor o animal para cetose e fígado gordo (Houe *et al.* 2001 citado por Mulligan *et al.*, 2006). Com a diminuição da IMS, diminui também a ingestão de minerais e vamos ter o efeito de “bola de neve” agravando ainda mais a hipocalcemia. A diminuição das contrações do abomaso e a sua motilidade pode levar a atonia, que por sua vez vai promover a fermentação da ingesta com a produção de gás. Este gás vai distender o abomaso e levar ao seu deslocamento (Goff & Horst, 2003).

Todas estas doenças do periparto, mas acima de tudo o balanço energético negativo e a diminuição de IMS, vão ter um impacto em termos reprodutivos e em muitos casos contribuir para o refugio dos animais.

### **1.11.3. Metrite e endometrite.**

O aumento da incidência de metrite e endometrite, numa primeira abordagem, podem ser explicadas pela maior incidência de doenças que predisponham para estas afecções, como distócia, RP e atrasos na involução uterina. No entanto, recentemente Kimura, Reinhardt & Goff (2006) descobriram que as vacas com hipocalcémia eram vacas com imunossupressão. Sabe-se que para activação das células imunitárias é necessário que ocorra um aumento da concentração de Cai intracelular que vai funcionar como mensageiro secundário a sinais extracelulares (Williams, 2001). O trabalho de Kimura *et al* (2006) veio suportar esta teoria, pois conseguiu provar que vacas com hipocalcémia têm baixas reservas de Cai intracelular (retículo endoplasmático rugoso e mitocôndria) o que não vai permitir um aumento da concentração de Cai no citosol, em resposta ao sinal externo compatível, com uma eficaz activação da célula imunitária.

Um trabalho desenvolvido por Mateus & Lopes da Costa (2002) demonstrou que havia uma maior incidência de endometrite em vacas com hipocalcémia subclínica quando comparadas com vacas com normocalcémia. Mais recentemente, Whiteford & Sheldon (2005) citado por Mulligan *et al.* (2006) chegaram às mesmas conclusões no Reino Unido.

### **1.11.4. Mastite**

Após tudo o que se disse acima facilmente se percebe que efectivamente pode haver relação entre hipocalcémia e mastite. Em primeiro lugar os níveis baixos de Ca vão afectar a contração do músculo liso, sendo o esfíncter do teto constituído por este tipo de músculo, o seu correcto encerramento fica comprometido e o mau encerramento facilmente permite o acesso aos tecidos da glândula mamária a microrganismos. Em segundo lugar, sabe-se também que as vacas no periparto sofrem sempre de algum grau de défice de imunidade, seja por diminuição das reservas de Ca, ou seja, por aumento do

cortisol devido à hipocalcemia ou ao *stress* do parto (Horst & Jorgensen, 1982; Goff & Horst, 2003; Kimura *et al.*, 2006).

### **1.11.5. Fertilidade**

Quase todas as doenças no periparto têm um impacto negativo em termos reprodutivos principalmente quando se quer que a vaca volte o mais rapidamente possível ao estro. Dessas doenças as que têm maior impacto são as distócias, RPs, metrites e endometrites. O impacto da endometrite prende-se principalmente com o prolongamento do anestro pós-parto, quistos lúteos e foliculares (Mateus & Lopes da Costa, 2002). O balanço energético negativo quando acentuado pode provocar um atraso da entrada novamente em ciclo estrico. Em associação à hipocalcemia há ainda efeitos negativos mais directos, o seu efeito no músculo liso vai atrasar a involução uterina (Borsberry and Dobson 1989 citado por Mulligan *et al.*, 2006) e reduzir o suprimento sanguíneo aos ovários (Jonsson & Daniel, 1997).

O impacto na reprodução pode trazer consequências sérias para exploração. Um trabalho de Borsberry and Dobson (1989) no Reino Unido comparando vacas com níveis baixos de Ca com vacas com normocalcemia chegou à conclusão que as primeiras necessitavam de maior número de inseminações para ficarem gestantes (1,7 contra 1,2), um intervalo entre o parto e a primeira inseminação mais longo (68 contra 61 dias) e um intervalo entre o parto e inseminação fertilizante também maior (88 contra 76).

## **2. Objectivos**

- I) Determinação da prevalência de hipocalcemia subclínica em vacas no período pós-parto nas três explorações e comparação desses valores entre os grupos em estudo e entre explorações.
- II) Avaliação do efeito da administração de Duphafrol D<sub>3</sub> 1000<sup>®</sup> no ante-parto nos níveis de calcemia;
- III) Determinação da correlação entre administração de Duphafrol D<sub>3</sub> 1000<sup>®</sup> e a produção de leite nos primeiros 100 dias de lactação;

- IV) Determinação da correlação entre a administração de Duphaftral D<sub>3</sub> 1000<sup>®</sup> e o intervalo entre o parto e a primeira inseminação e o número de inseminações necessárias para nova concepção;
- V) Determinação da correlação entre administração de Duphaftral D<sub>3</sub> 1000<sup>®</sup> e a ocorrência de doenças pós-parto (retenção placentária, metrite, deslocamento do abomaso, mastite e cetose).
- VI) Determinação da relação do efeito do Duphaftral D<sub>3</sub> 1000<sup>®</sup> com o número de lactações.

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1. Descrição da exploração em estudo**

O estudo decorreu no período de 31 de outubro de 2014 a 31 de abril de 2015 em três explorações de bovinos leiteiros nos arredores de Lisboa. A exploração A região localizada no centro litoral de Portugal e a exploração B e C situadas no Ribatejo.

##### **3.1.1. Exploração A**

Exploração em regime de produção intensivo, com cerca de 230 vacas em lactação. A partir de 2007, a raça HF deixou de ser exclusiva na exploração e deu-se início a um programa de *crossbreeding* com introdução de sémen proveniente de touros de outras raças de aptidão de produção de leite: raças Montbéliarde e Vermelha Sueca. Inicialmente, apenas 30% do efectivo foi cruzado com outras raças. Presentemente, apenas 5-10% dos animais mantêm uma linhagem pura HF.

A alimentação é baseada no conceito de mistura total ou TMR (*Total Mixed Ration*) e é constituída por silagens, feno e concentrado que inclui diversas matérias-primas. A alimentação é distribuída através de sistema de mistura, duas vezes por dia nas vacas em lactação e uma vez por dia nas vacas em período seco. Estas têm ainda feno disponível *ad libitum*.

Nesta exploração não é utilizado qualquer método para prevenção de hipocalcémia.

### **3.1.2. Exploração B**

Exploração em regime de produção intensivo com um efectivo de cerca de 830 animais, 400 dos quais em ordenha. Aqui a maioria dos animais pertencem à raça HF existindo no entanto ainda alguns animais resultado de *crossbreeding*. Nesta exploração há alguns anos atrás também se iniciou um programa de *crossbreeding* com introdução de sémen proveniente de touros de outras raças de aptidão de produção de leite: raças Montbéliarde e Vermelha Sueca. Programa entretanto abandonado devido ao facto de não se terem atingido os resultados pretendidos, mantendo-se ainda alguns animais que ficaram desse programa.

A alimentação é baseada no conceito de TMR e é constituída por silagens, feno e concentrado que inclui diversas matérias-primas. A dieta das vacas no pré-parto é suplementada com compostos acidificantes (dietas aniónicas) e a monitorização feita pela determinação do pH urinário.

Nesta exploração a administração de cálcio injectável é feita por rotina em todos os animais a partir da segunda lactação logo que possível após o parto.

### **3.1.3. Exploração C**

Exploração intensiva de bovinos de leite de grandes dimensões, com cerca de 800 vacas em lactação, localizada no Ribatejo e cujo efectivo é exclusivamente composto por vacas de raça HF. O maneio alimentar da exploração consiste em dois tipos de ração, sendo uma própria para as vacas em lactação e outra para as vacas que se encontram no período seco e no pré-parto.

Nesta exploração não é utilizado qualquer método para prevenção de hipocalcémia.

Esta exploração conta com a presença permanente de um veterinário.

## **3.2. Tipo de estudo**

Foi efectuado um estudo do tipo descritivo e observacional analítico.

## **3.3. Amostra**



A amostra foi obtida de forma aleatória estratificada utilizando o software Microsoft Excel, ou seja separamos os animais por lactação e só depois foi feito o sorteio, para determinar o tamanho de uma amostra com base na estimativa da média populacional, com um intervalo de confiança de 90%, formaram-se dois grupos de estudo por exploração:

- Exploração A [grupo Controlo (n=20) e grupo teste com administração de Duphaftral D<sub>3</sub> 1000<sup>®</sup> (n=24)];
- Exploração B [grupo controlo (n=22) e grupo com administração de Duphaftral D<sub>3</sub> 1000<sup>®</sup> (n=29)];
- Exploração C [grupo controlo (n=27) e grupo com administração de Duphaftral D<sub>3</sub> 1000<sup>®</sup> (n=31)].

Nestes grupos não foram incluídas vacas de primeira lactação (primíparas) pois são animais em que a prevalência de hipocalcémia clínica é quase nula e a hipocalcémia subclínica muito baixa e dificilmente se perceberia o efeito do Duphaftral D<sub>3</sub> 1000<sup>®</sup>. Nos grupos tentou-se equilibrar ao máximo o número de lactações, o que nem sempre foi possível devido a diversos problemas de ordem técnica.

### **3.4. Desenho experimental**

Grupo teste:

- administração de 10 ml Duphaftral D<sub>3</sub> 1000<sup>®</sup> (10 000 000 UI), via intramuscular, seis dias antes da data prevista para o parto, mas admitindo ao estudo todos os animais aos quais a administração ocorreu entre os 8 e os 2 dias antes do parto (de acordo com o RCM do medicamento). Administração de uma 2<sup>a</sup> dose de Duphaftral D<sub>3</sub>1000<sup>®</sup>, caso o intervalo entre a 1<sup>a</sup> administração e o parto exceda os 8 dias (de acordo com o RCM do medicamento).

- recolha de uma amostra de sangue entre as 6 e as 24h após o parto
- separação, após coagulação sanguínea, do soro e sua congelação para posterior envio para o laboratório e medição do cálcio total
- registo de ocorrência de doenças no pós-parto e seguimento clínico e reprodutivo da vaca até à primeira inseminação.
- registo da produção leiteira.

Grupo Controlo:

- administração de placebo (soro fisiológico) antes do parto segundo o protocolo referido para o grupo teste.

- colheitas e registos segundo protocolo referido para grupo teste

Motivos de exclusão do estudo:

- não permanência na exploração durante todo o período de estudo (morte, refugo ou venda) excepto se o motivo for alguma das doenças em estudo;

- administração de cálcio (oral ou injectável) antes da colheita da amostra de sangue;

- não cumprimento do intervalo de tempo para a recolha de amostra de sangue (por defeito ou por excesso, ou seja, recolha antes das 12h pós-parto ou após as 24h);

- não cumprimento do intervalo de tempo entre a administração de Duphafra<sub>3</sub> 1000 e o parto de acordo com o que está descrito no RCM (ex. vacas que pariram num período inferior às 48h após a administração de Duphafra<sub>3</sub> 1000; vacas que pariram num período superior aos 8 dias após a administração de Duphafra<sub>3</sub> 1000 sem que lhes tenha sido administrada uma 2<sup>a</sup> dose).

### **3.5. Recolha de dados**

O presente estudo foi realizado entre os meses de Outubro de 2014 e Maio de 2015 na exploração A e C e entre Outubro de 2014 e Janeiro de 2015 na exploração B.

Durante a realização do estudo não foi possível controlar, na amostra seleccionada, quaisquer mudanças na ração e/ou administrações de medicamentos, como a administração de PGF<sub>2</sub>-alfa, determinadas pelas necessidades/política da exploração.

Na construção da base de dados foram considerados: o número de lactações, a data do parto, valor da calcémia, produção leiteira nos primeiros 100 dias, data da primeira inseminação após o parto, número de inseminações após o parto até nova concepção, retenção placentária (manutenção da placenta por mais 12h após o parto), metrite, deslocamento do abomaso, mastite e cetose. Os dados recolhidos foram retirados das bases de dados das explorações.

### **3.6. Colheita das amostras**

As amostras de sangue foram colhidas mediante punção da veia coccígea ou veia jugular, com agulha descartável acoplada a tubo *Monovette Serum*<sup>®</sup>. As amostras foram deixadas a coagular à temperatura ambiente durante 2 horas ou até se observar a separação do coágulo e do soro. De seguida os tubos foram colocados em frigorífico durante 24 horas. Na recolha do soro (mais límpido possível) usou-se uma pipeta descartável para um tubo de 2 ml e de seguida congelou-se o soro entre -18 e -20°C. Pormenores do procedimento podem ser consultados em anexo.

A determinação do cálcio total ( $Ca_{total}$ ) foi realizada no laboratório de Sanidade Animal e Segurança Alimentar, SA (SEGALAB).

As amostras de sangue foram recolhidas entre as 12 e 24h após o parto sempre que possível, conforme recomendações de Divers & Peek (2008), uma vez que os mecanismos de mobilização de Ca da vaca não são imediatamente eficazes (demoram um a dois dias), podendo ocorrer diminuição dos níveis sanguíneos de Ca e desenvolvimento de hipocalcémia momentânea logo após o parto. Na exploração B devido à necessidade de administração de Ca subcutâneo imediatamente após o parto admitimos amostras entre as 6 e as 24 horas.

Procedeu-se à determinação do valor de  $Ca_{total}$  em detrimento do valor de Ca ionizado, pois apesar de ser mais correcta e precisa a determinação de  $Ca_i$ , esta é mais dispendiosa. E como a maior parte dos trabalhos científicos usa o  $Ca_{total}$ , usando o mesmo método permite uma maior facilidade quando há necessidade de comparação de resultados entre trabalhos. Além disso, apesar de depender bastante do pH sanguíneo, o  $Ca_i$  é aproximadamente metade do  $Ca_{total}$ .

Considerou-se que uma vaca apresentava hipocalcémia subclínica quando os valores sanguíneos de  $Ca_{total}$  se encontravam entre 5 e 8 mg/dl (Mateus & Lopes da Costa, 2002).

### **3.7. Análise estatística**

Foram comparados os valores de calcémia entre os dois grupos e estudada a relação destes com a ocorrência de doenças do pós-parto, início de ciclicidade ovárica, número de inseminações necessárias para nova concepção e produção de leite.

O registo dos dados foi feito recorrendo ao programa Excel<sup>®</sup>, com o qual se construíram as tabelas e gráficos. Recorrendo ao programa de tratamento estatístico R<sup>®</sup> foi aplicado o tratamento estatístico das variáveis categóricas com o teste de Wilcoxon e para as variáveis binomiais foram aplicados os testes do qui-quadrado e o teste de Pearson.

Na análise descritiva simples dos valores dos parâmetros em estudo obtidos (Ca<sub>total</sub>, produção de leite aos 100 dias, número de dias até à primeira inseminação e número de inseminações até nova concepção) foram descritos a média, o desvio-padrão, o valor máximo, valor mínimo e número de animais em estudo.

Para o cálculo da prevalência foi utilizada a seguinte fórmula:  $n/N \times 100$  (n-casos observados; N-total de indivíduos observados).

Os dados numéricos foram tratados no programa de tratamento estatístico R<sup>®</sup> onde se submeteram ao teste não paramétrico de *Wilcoxon*. As doenças pós-parto foram definidas como uma variável binomial (presente=1 ou ausente=0) e também foram analisadas no programa de tratamento estatístico R<sup>®</sup> através de tabelas de contingência de onde foi retirado o qui-quadrado e a significância. Para todos os testes utilizou-se uma significância de  $\alpha=0,05$ .

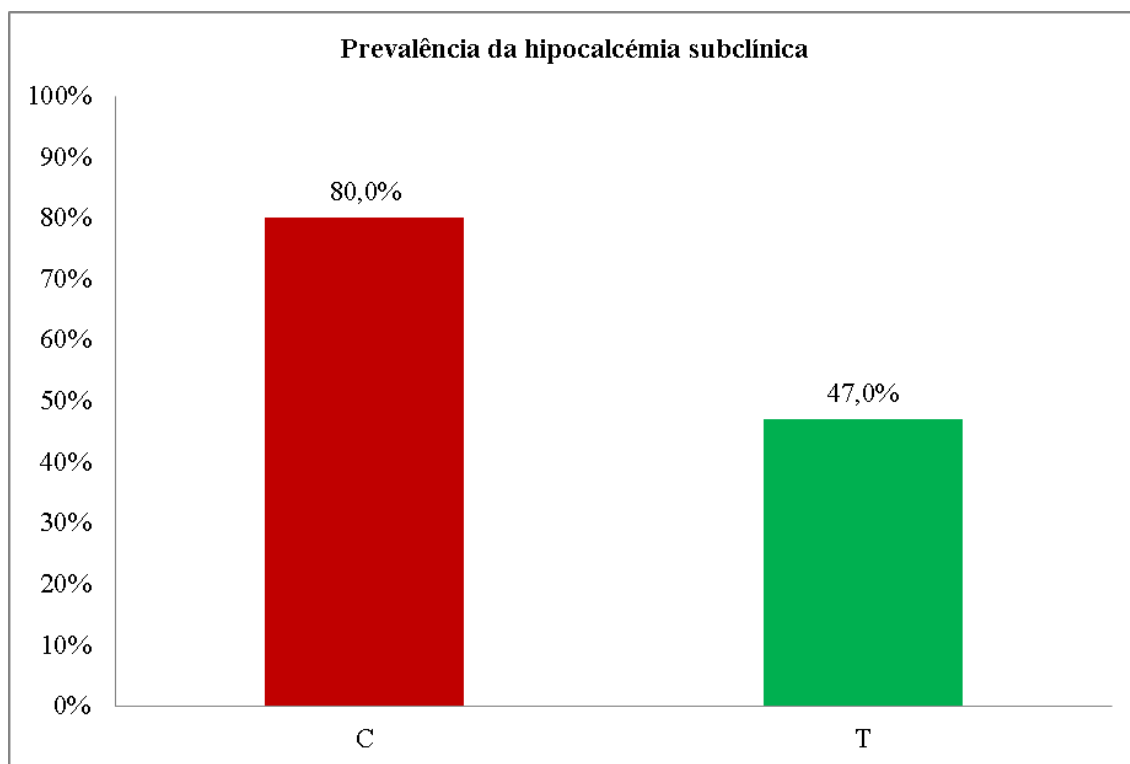
## **4. Resultados**

### **4.1. Análise dos dados totais**

O presente estudo inclui 153 vacas leiteiras com duas ou mais lactações. Destas, 83 foram seleccionadas para o grupo teste e 70 para o grupo controlo. Alguns animais não chegaram ao final do estudo, como se pode ver na Tabela 2, não tendo sido possível obter informação sobre a produção leiteira dos primeiros 100 dias, nem a data da primeira inseminação após o parto e nem o número de inseminações necessárias a uma nova gestação.

Ao analisarem-se os resultados da calcémia de todos os animais de todas as explorações em estudo, encontrou-se uma prevalência de 80,0% IC<sub>95%</sub> [69,2%;87,7%] de hipocalcémia subclínica (5-8,0 mg\dl) no grupo controlo e apenas 47,0% IC<sub>95%</sub> [36,6%;57,6%] no grupo teste.

**Figura 6** - Gráfico com as prevalências da hipocalcemia subclínica (5-8,0 mg/dl) do grupo teste (T) e o do grupo controlo (C), de todas as vacarias estudadas.



A média dos valores de  $Ca_{total}$  do grupo teste foi de  $7,98 \pm 1,12$  mg/dl, superior ao grupo controlo no qual se verificou um valor de  $7,23 \pm 1,21$  mg/dl. A diferença da calcémia entre o grupo teste e o grupo controlo ( $p < 0,01$ ) é estatisticamente significativa.

Determinou-se também as diferenças entre o grupo controlo e o grupo teste na produção leiteira dos primeiros 100 dias, intervalo entre o parto e a primeira inseminação e o número de inseminações necessárias a uma nova gestação.

Nos restantes parâmetros analisados não foram encontradas diferenças relevantes como se pode ver na Tabela 2.

**Tabela 2** - Análise descritiva dos dados totais obtidos das 3 explorações.

Parâmetros	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio-Padrão	Significância
<b>Calcémia T</b>	83	4,89	11,11	7,94	1,12	p<0,01
<b>Calcémia C</b>	70	4,01	12,99	7,23	1,21	
<b>P100 dias T</b>	77	363,00	7084,00	4535,62	1213,06	p=0,5261
<b>P100 dias C</b>	68	656,00	6116,00	4634,54	1066,75	
<b>1ª Inseminação T</b>	68	31,00	171,00	68,37	25,01	p=0,0713
<b>1ª Inseminação C</b>	65	36,00	121,00	63,18	17,96	
<b>Nº Iseminações T</b>	68	1,00	5,00	2,22	1,16	p=0,5810
<b>Nº Inseminações C</b>	65	1,00	5,00	2,14	1,21	

Grupo teste (T), grupo controlo (C), N (número de indivíduos observados), calcémias em mg/dl, P100 (produção nos primeiros 100 dias em kg de leite), 1ª inseminação (intervalo até primeira inseminação pós-parto em dias) e nº inseminações (número de inseminações necessárias até uma nova gestação).

Os resultados da análise das doenças puerperais podem ser observados na Tabela 3. No grupo teste verificou-se uma prevalência de retenções placentárias de 19,3 % IC95% [12,2%;29,1%] (16 vacas) e no controlo de 21,4% IC95% [13,4%;32,4%] (15 vacas). A prevalência de metrite foi de 19,3% IC95% [12,2%;29,1%] (16 vacas) no grupo teste e 25,7% IC95% [16,9%;37,1%] (18 vacas) no grupo controlo. Verificaram-se ainda 10 deslocamentos do abomaso no grupo teste, representando uma percentagem de 12,1% IC95% [6,7%;20,8%] e 2 no grupo controlo que corresponde a 2,9% IC95% [0,79%;9,8%]. A mastite foi a doença com prevalência mais elevada, com 21 casos no grupo teste ou seja 25,3% IC95% [17,2%;35,6%] e 14 no grupo controlo que constitui 20,0% IC95% [12,3%;30,8%] do efectivo estudado. A prevalência de cetose clínica foi muito baixa, verificando-se apenas sete casos no grupo teste o que representou uma percentagem de 8,4% IC95% [4,1%;16,4%] e um caso no grupo controlo que representa 1,4% IC95% [0,25%;7,7%].

Apesar das diferenças entre os valores dos dois grupos apenas se observou uma diferença significativa para o deslocamento do abomaso com o teste do ( $\chi^2=4,4381$  e  $p<0,05$ ). Verificamos também que grande parte dos animais com retenção placentária tem

simultaneamente metrite como verificado pelo teste do qui-quadrado ( $\chi^2 = 6,1145$ ) e pela significância ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3** - Diferença na prevalência de doenças do pós-parto em vacas do grupo teste e do grupo controlo.

Parâmetros	Teste	Controlo	Qui-quadrado	Significância
Retenção Placentária	16	15	0,1088	$p=0,7415$
Metrite	16	18	0,9104	$p=0,3400$
Deslocamento Abomaso	10	2	4,4381	$p < 0,05$
Mastite	21	14	0,6049	$p=0,4367$
Cetose	7	1	3,7605	$p=0,0525$

#### 4.2. Análise dos dados da exploração A

A exploração A é constituída maioritariamente por animais cruzados através de um programa de *crossbreeding* com introdução de sémen proveniente de touros de outras raças de aptidão de produção de leite: raças Montbéliarde e Vermelha Sueca. Foram seleccionados aleatoriamente 24 indivíduos para o grupo teste e 20 animais para o grupo controlo. Do primeiro grupo não se obteve o valor da produção aos 100 dias de quatro animais, pois foram refugadas devido a mastite (foram incluídos porque sofreram uma doença em estudo). Além destes animais outros três não voltaram a entrar à reprodução também por refugo.

Os valores médios de  $Ca_{total}$  do grupo teste foram de  $7,98 \pm 0,95$  mg/dl significativamente superiores ao grupo controlo  $7,17 \pm 0,98$  mg/dl ( $p < 0,05$ ).

Nos outros parâmetros testados não foram observadas diferenças significativas.

**Tabela 4 - Análise descritiva dos dados da exploração A.**

Parâmetros	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio-Padrão	Significância
<b>Calcémia T</b>	24	6,56	10,60	7,98	0,95	P<0,05
<b>Calcémia C</b>	20	5,14	8,29	7,17	0,98	
<b>P100 dias T</b>	20	3951,00	6148,00	4973,90	649,19	p=0,2211
<b>P100 dias C</b>	20	4324,00	6116,00	5207,60	530,91	
<b>1ª Inseminação T</b>	17	38,00	171,00	65,59	38,54	p=0,6474
<b>1ª Inseminação C</b>	20	36,00	121,00	62,95	22,99	
<b>Nº Inseminações T</b>	17	1,00	4,00	2,12	0,99	p=0,6381
<b>Nº Inseminações C</b>	20	1,00	5,00	2,05	1,19	

Grupo teste (T), grupo controlo (C), N (número de indivíduos observados), calcémias em mg/dl, P100 (produção nos primeiros 100 dias em kg de leite), 1ª inseminação (intervalo até primeira inseminação pós-parto em dias) e nº inseminações (número de inseminações necessárias até a vaca ficar novamente gestante).

As doenças puerperais observadas em ambos os grupos não apresentaram diferenças significativas (Tabela 5). No grupo teste verificou-se uma prevalência de retenções placentárias de 25,0% IC<sub>95%</sub> [12,0%;44,9%] (6 vacas) e no controlo de 30,2% IC<sub>95%</sub> [14,6%;51,9] (6 vacas). A prevalência de metrite foi de 8,3% IC<sub>95%</sub> [2,3%;25,8%] (2 vacas) no grupo teste e 25,0% IC<sub>95%</sub> [11,2%;46,9%] (cinco vacas) no grupo controlo. Verificou-se apenas um DA no grupo controlo representando uma percentagem de 4,2% IC<sub>95%</sub> [0,74%;20,3%]. O número de mastites foi mais elevado no grupo teste, 33,3% IC<sub>95%</sub> [18,0%;53,3%] (oito vacas) em relação ao grupo controlo 15,0% IC<sub>95%</sub> [5,2%;36,0%] (três vacas). A prevalência de cetose foi muito baixa, apenas numa vaca do grupo teste, representando 4,2% IC<sub>95%</sub> [0,74%;20,3%].



**Tabela 5** - Diferença na prevalência de doenças do pós-parto em vacas do grupo teste e do grupo controle na exploração A.

Parâmetros	Teste	Controle	Qui-quadrado	Significância
<b>Retenção Placentária</b>	6	6	0,1375	p=0,7108
<b>Metrite</b>	2	5	2,2651	p=0,1323
<b>Deslocamento Abomaso</b>	0	1	1,2279	p=0,2678
<b>Mastite</b>	8	3	1,9556	p=0,1620
<b>Cetose</b>	1	0	0,8527	p=0,3558

### 4.3. Análise dos dados da exploração B

Na exploração B a maioria dos animais pertencem à raça *Holstein-Frísia* existindo no entanto ainda alguns animais resultantes de crossbreeding.

Os valores médios de  $Ca_{total}$  do grupo teste foram de  $8,30 \pm 1,22$  mg/dl significativamente superiores ao grupo controle  $7,82 \pm 1,37$  mg/dl. Nesta exploração quando se compararam as médias do número de inseminações necessárias a uma nova gestação verificou-se uma diferença importante. O grupo em teste necessita em média de  $2,46 \pm 1,27$  inseminações para a vaca ficar novamente gestante enquanto o grupo controle necessitou apenas de  $2,19 \pm 1,40$  ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 6** - Análise descritiva dos dados da exploração B.

Parâmetros	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio-Padrão	Significância
<b>Calcémia T</b>	28	5,92	11,11	8,30	1,22	p<0,05
<b>Calcémia C</b>	23	5,72	12,99	7,82	1,37	
<b>P100 dias T</b>	27	3180	7084	5068	883,17	p=0,5640
<b>P100 dias C</b>	21	2758	5960	4740	985,92	
<b>1ª Inseminação T</b>	26	40	104	75,38	15,1	p=0,3968
<b>1ª Inseminação C</b>	21	51	116	68,86	18,09	
<b>Nº Inseminações T</b>	26	1	5	2,46	1,27	p<0,05
<b>Nº Inseminações C</b>	21	1	5	2,19	1,4	

Grupo teste (T), grupo controlo (C), N (número de indivíduos observados), calcémias em mg/dl, P100 (produção nos primeiros 100 dias em kg de leite), 1ª inseminação (intervalo até primeira inseminação pós-parto em dias) e nº inseminações (número de inseminações necessárias até a vaca ficar novamente gestante).

As doenças puerperais detectadas no grupo controlo e no grupo teste estão contabilizadas na Tabela 7. No grupo teste verificou-se uma prevalência de retenções placentárias de 21,4% IC<sub>95%</sub> [10,2%;39,5%] (seis vacas) e no controlo 17,4% IC<sub>95%</sub> [7,0%;37,1%] (quatro vacas). A prevalência de metrite foi de 32,1% IC<sub>95%</sub> [17,9%;56,6%] (nove vacas) no grupo teste e 43,5% IC<sub>95%</sub> [25,6%;63,2%] (10 vacas) no grupo controlo. Verificaram-se DA no grupo teste representando uma percentagem de 14,3% IC<sub>95%</sub> [5,7%;31,5%] (quatro vacas). O número de mastites foi igual nos dois grupos, representando uma prevalência de 35,7% IC<sub>95%</sub> [20,7%;54,2%] (10) no grupo teste e 43,5% IC<sub>95%</sub> [25,6%;63,2%] (10) no grupo controlo. Houve apenas um caso de cetose clínica no grupo controlo representando 4,4% IC<sub>95%</sub> [0,77%;21,0%] e duas no grupo teste que representa uma prevalência de 7,1 % IC<sub>95%</sub> [2,0%;22,6%].

**Tabela 7** - Diferença na prevalência de doenças do pós-parto em vacas do grupo teste e do grupo controle na exploração B.

Parâmetros	Teste	Controle	Qui-quadrado	Significância
<b>Retenção Placentária</b>	6	4	0,1306	p=0,7178
<b>Metrite</b>	9	10	0,6941	p=0,4048
<b>Deslocamento Abomaso</b>	4	0	3,5653	p=0,0590
<b>Mastite</b>	10	10	0,3193	p=0,5720
<b>Cetose</b>	2	1	0,1782	p=0,6729

#### 4.4. Análise dos dados da exploração C

Na exploração C todos os animais pertencem à raça HF. Existe algum cuidado nas dietas pré-parto sobretudo no conteúdo mineral (Ca, Mg e K). Apesar disso as médias foram baixas em ambos os grupos, sendo um pouco mais elevadas no grupo teste, demonstrando algum efeito da Vitamina D<sub>3</sub>. No período do estudo verificou-se um número anormalmente elevado de deslocamentos do abomaso e devido a complicações pós-cirúrgicas levou também a um número anormalmente elevado de mortalidade.

Os valores de Ca<sub>total</sub> do grupo teste foram de 7,59 ± 1,07 mg/dl significativamente superiores ao grupo controle 6,78 ± 1,03 mg/dl (p<0,05). Os restantes parâmetros não apresentaram diferenças relevantes entre os dois grupos como se pode verificar na tabela 8.

**Tabela 8** - Análise descritiva dos dados da exploração C.

Parâmetros	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio-Padrão	Significância
<b>Calcémia T</b>	31	4,89	9,3	7,59	1,07	p<0,01
<b>Calcémia C</b>	27	4,01	8,4	6,78	1,03	
<b>P100 dias T</b>	30	363	5300	3764,23	1367,1	p=0,2125
<b>P100 dias C</b>	27	656	5433	4128,37	1204,64	
<b>1ª Inseminação T</b>	25	31	110	65,76	16,79	p=0,1702
<b>1ª Inseminação C</b>	24	40	77	58,42	11,1	
<b>Nº Inseminações T</b>	25	1	4	2,04	1,14	p=0,6592
<b>Nº Inseminações C</b>	24	1	4	2,17	1,09	

Grupo teste (T), grupo controlo (C), N (número de indivíduos observados), calcémias em mg/dl, P100 (produção nos primeiros 100 dias em kg de leite), 1ª inseminação (intervalo até primeira inseminação pós-parto em dias) e nº inseminações (número de inseminações necessárias até a vaca ficar novamente gestante).

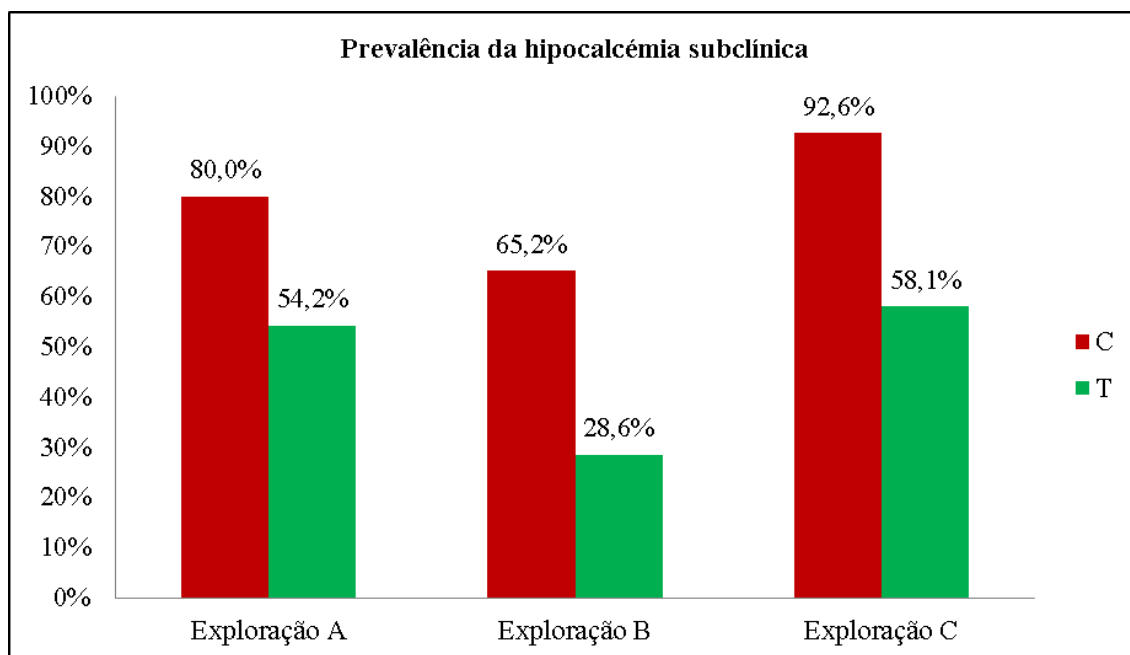
As doenças puerperais detectadas estão contabilizadas e descritas na Tabela 9. No grupo teste verificou-se uma prevalência de retenções placentárias de 12,9% IC<sub>95%</sub> [5,1%;28,9%] (quatro vacas) e no controlo 18,5% IC<sub>95%</sub> [8,2%;36,7%] (cinco vacas). A prevalência de metrite foi de 16,1% IC<sub>95%</sub> [7,1%;32,6%] (cinco vacas) no grupo teste e 11,1% IC<sub>95%</sub> [3,9%;28,1%] (três vacas) no grupo controlo. Verificou-se seis DA no grupo teste representando uma percentagem de 19,4% IC<sub>95%</sub> [9,2%;36,3%] e um DA no grupo controlo representando uma prevalência de 3,7% IC<sub>95%</sub> [0,66%;18,3%]. O número de mastites foi muito baixo, uma no grupo controlo representando uma prevalência de 3,7% IC<sub>95%</sub> [0,66%;18,3%] e três no grupo teste que representam uma prevalência de 9,7% IC<sub>95%</sub> [3,4%;24,9%]. O número de cetoses foi muito baixo, verificando-se apenas quatro casos no grupo teste o que representou uma prevalência de 12,9% IC<sub>95%</sub> [5,1%;28,9%].

**Tabela 9** - Diferença na prevalência de doenças do pós-parto em vacas do grupo teste e do grupo controle na exploração C.

<b>Parâmetros</b>	<b>Teste</b>	<b>Controle</b>	<b>Qui-quadrado</b>	<b>Significância</b>
<b>Retenção Placentária</b>	4	5	0,3471	p=0,5558
<b>Metrite</b>	5	3	0,3056	p=0,5804
<b>Deslocamento Abomaso</b>	6	1	3,3310	p=0,0680
<b>Mastite</b>	3	1	0,8020	p=0,3705
<b>Cetose</b>	4	0	3,7419	p=0,0531

Analisando as três explorações e as diferenças entre os grupos controle e teste verifica-se que o número de animais com hipocalcemia subclínica do grupo controle é sempre superior em relação ao grupo teste. Na exploração A a percentagem de animais em hipocalcemia subclínica no grupo controle é de 80,0% IC<sub>95%</sub> [58,4%;91,9%] e no grupo teste é de 54,2% IC<sub>95%</sub> [35,1%;72,1%]. Na exploração B a percentagem de animais com hipocalcemia subclínica no grupo controle é de 65,2% IC<sub>95%</sub> [44,9 %;81,2%], e no grupo teste é de 28,6% IC<sub>95%</sub> [15,3%;47,1%]. Na exploração C a percentagem de animais em hipocalcemia subclínica no grupo controle é de 92,6% IC<sub>95%</sub> [76,6%;97,9%] e no grupo teste é de 58,1% IC<sub>95%</sub> [40,8%;73,6%] (Figura 6).

**Figura 7** - Gráfico da percentagem de vacas em hipocalcémia subclínica (<8 mg/dl) nas três explorações no grupo teste (T) e no grupo controlo (C).



#### 4.5. Análise da calcémia em associação com as doenças pós-parto

Quando analisamos a calcémia dos animais que sofreram doenças puerperais verificamos que o intervalo dos valores de cálcio é bastante amplo (Tabela 10). Os 31 animais que sofreram retenção placentária apresentaram  $7,62 \pm 1,16$  mg/dl de média de calcémia. As 34 vacas que sofreram metrite apresentaram  $7,68 \pm 1,48$  mg/dl de média de calcémia. A média de calcémia apresentada pelos 12 animais que sofreram deslocamento do abomaso foi de  $7,91 \pm 1,33$  mg/dl. Os 35 animais que sofreram mastite apresentaram  $7,60 \pm 1,12$  mg/dl de média de calcémia e os oito animais que sofreram metrite apresentaram  $7,41 \pm 0,76$  mg/dl de média de calcémia.

**Tabela 10** - Estatística descritiva dos valores de calcemia (mg/dl) dos animais que sofreram doenças pós-parto.

Parâmetros	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
<b>Retenção Placentária</b>	31	4,77	9,60	7,62	1,16
<b>Metrite</b>	34	4,89	12,99	7,68	1,48
<b>Deslocamento Abomaso</b>	12	5,57	11,11	7,91	1,33
<b>Mastite</b>	35	5,69	11,11	7,60	1,12
<b>Cetose</b>	8	6,59	8,97	7,41	0,76

#### 4.6. Análise dos resultados tendo em conta a idade das vacas

Para perceber se a administração de vitamina D<sub>3</sub> tem um efeito mais pronunciado à medida que a vaca vai envelhecendo, comparamos os grupos tendo em conta o número de lactações e encontramos dois resultados relevantes (Tabela 11). O grupo de 2<sup>a</sup> lactação tratado (Grupo T) apresentou valores médios de calcémia bastante mais elevados (8,45±0,87 mg/dl) do que o grupo de 2<sup>a</sup> lactação que não recebeu tratamento (7,78±0,73 mg/dl) (p<0,05). Essa diferença também se verificou para as vacas com quatro ou mais lactações - grupo controlo (6,82±0,98 mg/dl); e o grupo tratamento (7,84±1,13 mg/dl).

Ao observarem-se as médias por lactação (no grupo Controlo) observa-se uma diminuição na calcémia à medida que o número de lactações aumenta. Curiosamente no grupo Teste a média da 3<sup>a</sup> lactação (7,63 mg/dl) é menor que a média da 4<sup>a</sup> lactação ou superior (7,84 mg/dl).

**Tabela 11** - Análise da calcémia tendo em conta o número de lactações.

Lactações	Grupo	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Significância
<b>2<sup>a</sup> Lactação</b>	T	24	7,16	10,47	8,45	0,87	p<0,01
	C	19	6,01	8,72	7,78	0,73	
<b>3<sup>a</sup> Lactação</b>	T	24	4,89	10,6	7,59	1,19	p=0,1384
	C	26	5,68	12,99	7,32	1,41	
<b>≥ 4<sup>a</sup> Lactação</b>	T	35	5,46	11,11	7,84	1,13	p<0,001
	C	25	4,77	8,14	6,82	0,98	

T=Grupo Teste; C=Grupo Controlo

Quando analisamos a média do número de dias até nova inseminação (Tabela 12), verificamos uma diferença significativa em animais da 3ª lactação, sendo que o grupo teste necessita de mais 12 dias para entrar novamente em cio ( $p < 0,0$ ).

**Tabela 12** - Diferenças entre o grupo teste e o grupo controle no número de dias após o parto necessários até à primeira inseminação tendo em conta o número de lactações do animal.

Lactações	Grupo	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Significância
2ª Lactação	T	21	31	110	63,62	20,19	p=0,6843
	C	19	36	116	61,16	18,24	
3ª Lactação	T	21	38	104	70,86	17,62	p<0,01
	C	26	41	105	58,85	12,85	
≥ 4ª Lactação	T	26	47	171	72,88	29,87	p=0,8485
	C	18	40	121	71,17	22,57	

T=Grupo Teste; C=Grupo Controle

Quando analisamos a média da calcémia à medida que a vaca vai avançando no número de lactações (Tabela 13), verificamos que esta é inversamente proporcional, ou seja, à medida que a vaca avança na idade a calcémia pós-parto vai sendo cada vez mais baixa. Quando comparamos a calcémia da 2ª lactação ( $7,78 \pm 0,73$  mg/dl) ela é superior à calcémia da 3ª lactação ( $7,32 \pm 1,41$  mg/dl) e de forma bastante significativa ( $p < 0,05$ ). Essa diferença é ainda mais acentuada entre a 2ª lactação ( $7,78 \pm 0,73$  mg/dl) e 4ª ou mais ( $6,73 \pm 1,10$  mg/dl) ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 13** - Diferenças da calcémia tendo em conta o número de lactações do grupo controle.

Lactações	Média	Desvio-Padrão	Significância
2ª Lactação	7,78	0,73	p<0,05
3ª Lactação	7,32	1,41	
2ª Lactação	7,78	0,73	p<0,01
≥ 4ª Lactação	6,73	1,10	

Para perceber se à medida que aumentam o número de lactações também aumenta a prevalência de certas doenças, distribuímos estas por lactação (Tabela 14). E verificamos que o número de retenções placentárias aumenta proporcionalmente ao aumento do número de lactações.



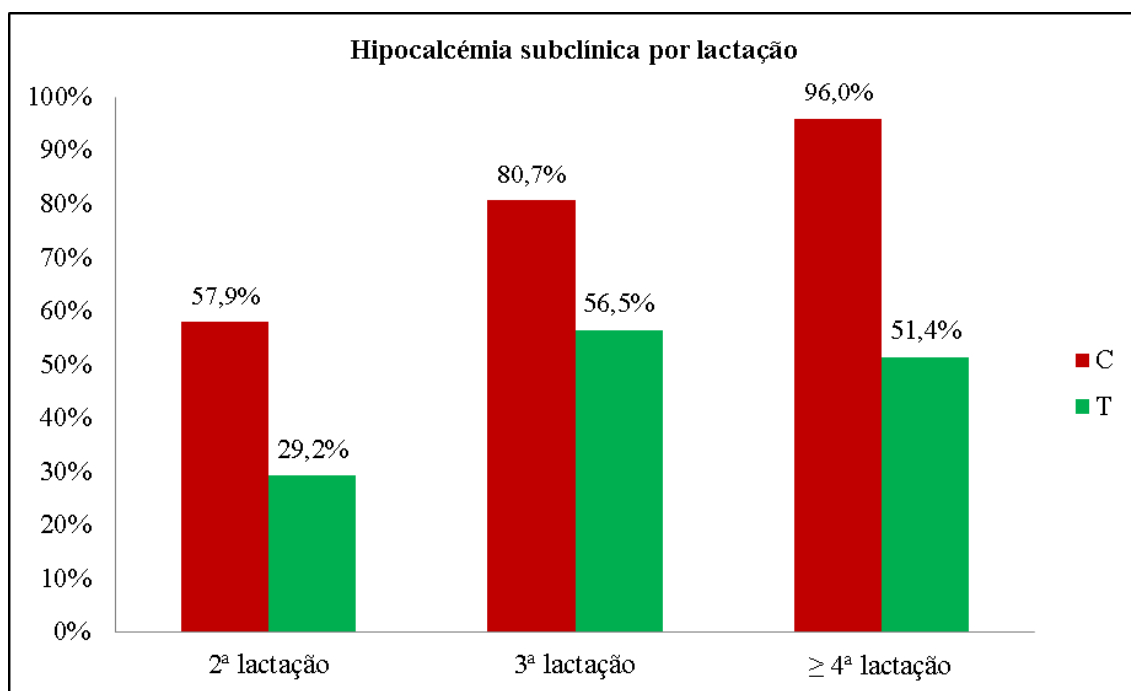
**Tabela 14** - Análise da retenção placentária à medida que a vaca envelhece no grupo controle.

Lactações	N	Qui-quadrado	Significância
3ª Lactação	4	3,8776	p<0,05
≥ 4ª Lactação	10		
2ª Lactação	1	6,9474	p<0,001
≥ 4ª Lactação	10		

≥ 4ª Lactação = quarta lactação ou superior

Ao analisar-se a prevalência da hipocalcemia subclínica verifica-se que esta aumenta com o aumento do número de lactações. As vacas de 2ª lactação apresentam uma prevalência de 57,9% IC<sub>95%</sub> [36,3%;78,9%], 3ª lactação 80,7% IC<sub>95%</sub> [62,1%;91,5%] e de 4ª lactação ou superior apresentam 96,0% [80,5%;99,3%]. No grupo tratado verificamos que houve uma redução da prevalência, as vacas de 2ª lactação apresentam 29,2% IC<sub>95%</sub> [14,9%;49,2%], 3ª lactação 56,5% IC<sub>95%</sub> [14,9%;49,2%] e 4ª lactação ou superior 51,4% IC<sub>95%</sub> [35,6%;67,0%]. Verificamos também, como já se tinha verificado na média das calcémias, que a prevalência de hipocalcemia subclínica é maior nos animais com três lactações e menor nas lactações superiores (Figura 8).

**Figura 8** - Gráfico da percentagem de vacas em hipocalcemia subclínica por lactação e por grupo em estudo (T – Teste e C – Controle). Dividiram-se os indivíduos por 2ª lactação, 3ª lactação e 4ª lactação ou superior (≥4ª lactação).



## 5. Discussão

### 5.1. Prevalência de hipocalcemia global

A prevalência de hipocalcemia subclínica de todos os animais em estudo das três vacarias, ( $Ca_{total}$  entre 5-8 mg/dl) obtida foi de 80,0% IC<sub>95%</sub> [69,2%;87,7%], resultado idêntico ao observado por Silveira, Silva, Afonso & Silva (2013) (dados não publicados) em explorações açorianas - 84,6% IC<sub>95%</sub> [74,8%;94,4%] e a Salgado-Hernández, Aparicio-Cecilio, Velásquez-Forero, Castillo-Mata & Bouda (2014) que foi de 70,0 a 80,0%. Este valor foi no entanto bastante superior ao encontrado por Koch (2013) na exploração C que foi na altura de 45,5% e também bastante superior aos resultados encontrados por Reinhardt *et al.* (2011) em explorações nos Estados Unidos que foi de 44%. O resultado pode ser justificado pelo elevado número, em comparação com o de Koch (2013), de vacas com 3 ou mais lactações. Dos animais que foram admitidos ao estudo 27% eram de 2<sup>a</sup> lactação, 37% de 3<sup>a</sup> lactação e 36% de 4<sup>a</sup> ou mais lactações e no estudo de Koch foram 58%, 26% e 16%, respectivamente. Como a hipocalcemia clínica e subclínica aumenta com a idade é natural que com uma percentagem tão elevada de animais mais velhos o valor final seja inflacionado (Reinhardt *et al.*, 2011; Koch, 2013; Oetzel, 2011). Quando comparado com os resultados obtidos por Reinhardt *et al.* (2011) uma diferença importante, que pode justificar em parte os resultados, foi a admissão ao seu estudo de amostras de sangue de animais recolhidas até às 48 horas após o parto, enquanto no nosso trabalho apenas foram admitidas amostras recolhidas entre as 12 e as 24 horas. Uma vez que os valores médios de  $Ca_{total}$  no plasma atingem normalmente os seus valores mais baixo entre as 12 e 24 horas pós-parto é normal que a incidência de hipocalcemia seja mais elevada nestas circunstâncias (Goff, 2008; Kimura *et al.*, 2006). Pelas diferenças de manejo entre as vacarias nomeadamente nos cuidados dietéticos no pré-parto.

Divers & Peek (2008) considerando animais com hipocalcemia subclínica todos os animais com calcemia inferior a 8,5 mg/dl entre as 12 e 24 horas após o parto, propõem que uma incidência de hipocalcemia superior a 30% deve ser considerada preocupante, sendo o caso deste estudo.

Quando analisamos a prevalência obtida no grupo ao qual foi administrada a vitamina D<sub>3</sub>, o valor obtido 47,0% IC<sub>95%</sub> [36,6%;57,6%] aproxima-se da prevalência dos vários estudos (Goff, Horst, Beitz & Littledike, 1988; Silveira *et al.*, 2013-dados não publicados). Isto reflete um forte efeito na mobilização de Ca pelo tratamento reduzindo em 33 pontos percentuais a hipocalcemia subclínica. Este valor está de acordo e dentro do intervalo de confiança observado por Silveira *et al.* (2013) (dados não publicados) em explorações açorianas após a administração de vitamina D<sub>3</sub> – 39,6% IC<sub>95%</sub> [26,5%;52,7%].

## **5.2. Prevalência de hipocalcemia em cada vacaria**

Apesar de raças diferentes, a exploração A com a maioria dos animais a resultarem de um programa de *crossbreeding* e a exploração C com animais exclusivamente da raça HF, apresentaram prevalências de hipocalcemia subclínica idênticas e dentro do intervalo de confiança do total dos animais, tanto no grupo Controlo como no grupo Teste. A redução da hipocalcemia entre o grupo controlo e o grupo teste na exploração A e na exploração B foi de 25,8 pontos percentuais e 44,6, respectivamente. A maior redução verificada na exploração C deve-se provavelmente a um elevado número de animais com calcemia abaixo das 8 mg/dl, tendo em conta os valores do grupo Controlo (Prevalência de 92,6% IC<sub>95%</sub> [76,6%;97,9%]) o que justifica um efeito mais acentuado da vitamina D<sub>3</sub>. Na exploração B a prevalência do grupo controlo foi de 65,2% IC<sub>95%</sub> [44,9 %;81,2%], este valor bastante mais baixo do que nas restantes explorações deve-se ao efeito da suplementação da dieta com sais acidificantes. No grupo teste verificou-se uma prevalência de 28,6% IC<sub>95%</sub> [15,3%;47,1%] o que se deveu provavelmente ao aumento do poder calcemiante por associação das dietas aniónicas com a administração de vitamina D<sub>3</sub>. Segundo (Wilkens *et al.*, 2012), a ligeira acidose provocada pela ingestão de dietas aniónicas que aumenta a resposta dos tecidos à PTH vai criar as condições ideais para um efeito calcemiante aumentado pela acção da vitamina D<sub>3</sub>.

## **5.3. Hipocalcemia e idade da vaca**

Há medida que o número de lactações vai aumentando a capacidade de mobilização de Ca pelo sistema endócrino vai sendo cada vez menor. Isto pôde ser observado pelos

valores da hipocalcemia subclínica do grupo controlo. Estes valores, apesar de bastante elevados estão de acordo com o aumento da hipocalcemia subclínica com o aumento do número de lactações (Reinhardt *et al*, 2011). As dificuldades das vacas mais velhas em manter a normocalcemia prendem-se com o aumento da mineralização óssea, diminuindo os locais activos de remodelação óssea, locais esses que permitem o fluxo de Ca para a corrente sanguínea (Goff, 2014). Por outro lado, à medida que a vaca envelhece o número de receptores de  $1,25D_3$  no intestino e no osso diminuem e aparentemente o número de receptores da PTH no rim, importantes para a segunda hidroxilação da vitamina  $D_3$  também diminuem com a idade (Horst *et al.*, 1990).

Verificamos também que aparentemente a vitamina  $D_3$  tem uma acção mais eficaz na mobilização de Ca em vacas com mais lactações. A diferença das médias da calcemia entre ambos os grupos de 2ª lactação é de 0,67 mg/dl ( $p < 0,01$ ), da 3ª lactação é 0,27 mg/dl ( $p = 0,1384$ ) e da 4ª lactação é 1,02 mg/dl ( $p < 0,001$ ). A redução da hipocalcemia subclínica entre o grupo controlo e o grupo teste foi de 28,7 pontos percentuais nos animais de 2ª lactação, 22,4 nos de 3ª lactação e 44,6 nos de 4ª lactação. Estes resultados mostram um efeito mais acentuado do tratamento nos animais com quatro lactações ou mais. A vitamina  $D_3$  aumenta no plasma sanguíneo à medida que o Ca diminui na corrente sanguínea, mas a partir precisamente da 3ª lactação este aumento segundo Reinhardt *et al* (2011) parece atingir um *plateau*. Apesar da diminuição do número de receptores de  $1,25D_3$  no intestino, a absorção de Ca intestinal parece aumentar de importância no restabelecimento da normocalcemia à medida que a idade da vaca aumenta. Não podemos esquecer no entanto que a diferença observada entre a terceira lactação e lactações superiores é mínima e está perfeitamente dentro do intervalo de confiança, por isso estas diferenças podem dever-se ao acaso. No entanto a suplementação de vitamina  $D_3$  em vacas mais velhas parece ser uma medida ainda mais eficaz do que em animais mais novos para minimizar o estado hipocalcemiantes em que estes animais se encontram no peri-parto.

#### 5.4. Calcémias

A média das calcémias do grupo controlo e do grupo teste foram de  $7,23 \pm 1,21$  mg/dl e de  $7,98 \pm 1,12$  mg/dl, respectivamente. Esta diferença mostrou ser significativa ( $p < 0,01$ ). Estes valores são idênticos aos obtidos por Silveira *et al* (2013) (dados não

publicados) na Ilha Terceira nos Açores (Teste=8,12±1,34 mg/dl e controlo=6,73±1,51 mg/dl).

Quando se analisam as médias da calcémia por exploração verifica-se que as diferenças entre os grupos são significativas e de acordo com as obtidas na Ilha Terceira por Silveira *et al* (2013). Na exploração B onde as vacas secas são alimentadas com dietas aniónicas os valores médios de Ca<sub>total</sub> do grupo teste (8,30 ± 1,22 mg/dl) e do grupo controlo (7,82 ± 1,37 mg/dl) são mais elevadas, resultado de acordo com o que está publicado (Wilkens *et al.*, 2012).

A média da calcémia diminui à medida que o número de lactações aumenta como provam os resultados obtidos, a 2<sup>a</sup> lactação foi de (7,78±0,73 mg/dl), 3<sup>a</sup> lactação de 7,59±1,19 mg/dl e 4<sup>a</sup> ou mais lactações (6,82±0,98 mg/dl). Ao analisarmos as médias dos grupos teste (2<sup>a</sup> lactação=8,45±0,87 mg/dl; 3<sup>a</sup> lactação=7,59±1,19 mg/dl; ≥4<sup>a</sup> lactação=7,84±1,13 mg/dl), verificamos que há diferenças significativas entre o grupo teste e o grupo controlo em todas as lactações e curiosamente, como já observado na prevalência da hipocalcémia subclínica, a média da calcémia do grupo teste da 4<sup>a</sup> lactação é superior à média da calcémia do grupo teste da 3<sup>a</sup> lactação.

### **5.5. Produção de leite aos 100 dias, primeira inseminação pós-parto e número de inseminações**

Na produção de leite nos primeiros 100 dias não foi possível estabelecer uma diferença significativa ( $p > 0,5261$ ) entre os animais Controlo (com média de calcémia mais baixa) e os animais do grupo Teste (com média de calcémia mais elevada). Apesar disso os dados mostram uma tendência para uma maior produção dos animais do grupo Controlo, quando analisamos os animais de cada vacaria isoladamente e quando analisamos os dados dos animais das três vacarias. Estes resultados estão de acordo com o que está descrito na literatura, Jawor, Huzzey, LeBlanc & von Keyserlingk (2012) verificaram que animais com hipocalcémia subclínica, sem desenvolvimento de doenças pós-parto, produzem mais 5,7 kg/dia de leite nas primeiras três a quatro semanas de lactação, quando comparados com animais com normocalcémia. Este trabalho concluiu também que apesar disso no final da lactação não havia grandes diferenças a nível produtivo. Mas este resultado contrasta com os resultados obtidos por (Chapinal *et al.*, 2012) uma vez que neste estudo as vacas com calcemias mais baixas produziram menos

leite. No entanto, na exploração B a maior produção foi observada no grupo Teste, este resultado pode no entanto dever-se não só a uma calcemia mais elevada mas também à alimentação com dietas suplementadas com agentes acidificantes no pré-parto, como foi descrito por DeGroot, Block & French (2010)- vacas no período seco alimentadas com dietas suplementadas com iões alcalinizantes produzem maior quantidade de leite. Este parâmetro não é fácil de analisar nas condições em que o estudo decorreu, pois a produção de leite depende de factores como a alimentação, que variava de exploração para exploração, de condição corporal, factor onde se observaram algumas diferenças entre as explorações, varia com a raça e com as claudicações, entre outros (Roche *et al.*, 2009). No intervalo médio entre o parto e a primeira inseminações não foram observadas diferenças significativas ( $p>0,0713$ ) entre os grupos. Observando-se até uma tendência para um maior intervalo no grupo teste ( $68,37 \pm 25,01$  dias) quando comparado com o grupo controlo ( $63,18 \pm 17,96$  dias), mas percebe-se que existem animais com o intervalo demasiado longo pelo elevado desvio padrão. O intervalo médio obtido na exploração A (T= $65,59 \pm 38,54$  dias e C= $62,95 \pm 22,99$  dias) é idêntico ao da exploração C (T= $65,76 \pm 16,79$  dias e C= $58,42 \pm 11,10$  dias), mas convém lembrar que na exploração C é usado em todos os animais um protocolo de inseminação artificial a tempo fixo com pré-sincronização e na exploração A são animais de *crossbreeding* sem protocolo de sincronização. Podemos também observar que o desvio padrão é bastante elevado na exploração A, ou seja, alguns animais tem um intervalo muito longo e na exploração C o desvio padrão tem cerca de metade desse valor. Não se encontraram diferenças significativas entre o grupo Tratamento e o grupo Controlo mas em média o período entre o parto e a primeira inseminação está abaixo dos 70 dias, valor de acordo com o que está descrito na literatura, o que aparentemente revela que estas explorações têm programas reprodutivos eficientes (Borsberry & Dobson, 1989). O número de inseminações necessárias ao estabelecimento de uma nova gestação após o parto permitiu avaliar a fertilidade entre os grupos em estudo. As diferenças não foram significativas na análise do total dos animais das três explorações e nas explorações A e C, tendencialmente foram necessárias mais inseminações no grupo Teste com média da calcemia mais elevada do que no grupo Controlo com média mais baixa. Este resultado não está de acordo com a literatura nomeadamente com os resultados obtidos por (Chamberlin *et al.*, 2013). Na exploração B a diferença no número de inseminações entre os grupos foi significativa ( $p<0,05$ ), sendo necessária ao grupo Teste mais

inseminações ( $2,46 \pm 1,27$ ) até ao estabelecimento de uma nova gestação, comparando com  $2,19 \pm 1,40$  inseminações do grupo Controlo. Apesar de não ser uma diferença muito acentuada, este resultado pode-se explicar-se com um maior número de doenças pós-parto no grupo Teste (31) quando comparado com o grupo Controlo (25) e de um modo geral com o elevado número de doenças pós-parto nesta exploração. Estes valores estão um pouco acima resultados encontrados na literatura (Borsberry & Dobson, 1989). Nesta exploração a todas as vacas é administrado cálcio subcutâneo, portanto todas as diferenças entre os dois grupos na evolução pós-parto ficam comprometidas. A conclusão a que podemos chegar, tendo em conta que as diferenças não são significativas é que se for administrada vitamina D às vacas estas não necessitam de administração de cálcio subcutâneo. No entanto, o ideal teria sido a determinação da calcémia nos dois grupos alguns dias após o parto para verificar as diferenças e reforçar as conclusões.

Apesar do número médio de inseminações estar acima do ideal ( $< 1,5$ ) em todas as explorações, tal facto poderá traduzir uma tendência para aumento dos índices reprodutivos nos últimos anos em explorações de leite intensivas. Convém no entanto realçar que na exploração C, com protocolo de inseminação artificial a tempo fixo com pré-sincronização, vários animais foram inseminados relativamente cedo no pós-parto e quase todos eles necessitaram de uma nova inseminação, mesmo animais novos nos quais normalmente a fertilidade é bastante elevada.

## **5.6. Doenças puerperais**

Ao analisarmos a prevalência de doenças puerperais ela nem sempre é real uma vez que algumas vacas sofreram mais do que uma doença no pós-parto, pois muitas delas aumentam o risco ou predisõem a outras.

Quando se fez a análise estatística das doenças puerperais da totalidade dos animais em estudo verificou-se uma associação relevante entre ambos os grupos do DA ( $p < 0,05$ ), este foi superior no grupo Teste em relação ao grupo Controlo. O resultado deveu-se essencialmente a um número anormalmente elevado de DA na exploração C, uma exploração em que os níveis médios de calcémia encontrados foram muito baixos em ambos os grupos. Os níveis baixos de cálcio provocam uma diminuição da motilidade

dos compartimentos gástricos e conseqüentemente uma diminuição da ingestão de matéria seca (IMS), esta associação pode levar a atonia do TGI, que por sua vez vai promover a fermentação da ingesta com a produção de gás. Este gás vai distender o abomaso e levar ao seu deslocamento (Daniel, 1983; Goff & Horst, 2003).

Apesar disso esta prevalência não deixa de ser surpreendente se analisarmos apenas os níveis de Ca, pois são animais com média de calcémia perto do nível mais baixo da normocalcémia ( $7,91 \pm 1,33$  mg/dl) e com poucas lactações. Mas como os factores de risco para DA são inúmeros, este resultado pode ser justificado com o facto de nesta exploração a alimentação ser adquirida fora e em diversos pontos do país, com mudanças constantes na dieta. A associação da constituição da dieta com a ocorrência de DA está há muito tempo provada (Radostitis *et al.*, 2007). Além disso, de um modo geral observaram-se inúmeras vacas com CC muito elevada (CC entre 4 e 5) o que constitui um factor de risco para doenças pós-parto tão ou mais elevado quando co-existe hipocalcémia. A CC elevada ao parto vai ter um efeito na diminuição da IMS muito acentuado, que por sua vez vai agravar o balanço energético negativo, promover um aumento da mobilização das reservas de gordura, que vai predispor o animal para cetose e fígado gordo (Houe *et al.* 2001 citado por Mulligan *et al.*, 2006). Com a diminuição da IMS, diminui também a ingestão de minerais e vamos ter o efeito de “bola de neve” agravando ainda mais a hipocalcémia. Uma percentagem de animais que foram submetidos a cirurgia do DA desenvolveram peritonite como provado à necrópsia, isto pode dever-se a níveis de infiltração de gordura elevados no fígado que diminuem as defesas imunitárias (Bobe, Young, & Beitz, 2004).

Encontrou-se também uma significância elevada ( $p < 0,05$ ) no aumento do risco de RP à medida que aumenta a idade da vaca. Este resultado está de acordo com o encontrado na literatura (Horta, 2000; Angrimani, Rui, Cruz, Romano, Lopes, 2011; Koch, 2013). Com o aumento da idade da vaca aumenta também o risco de hipocalcémia. Quando a concentração desce do limiar da 8 mg/dl e a vaca começa a entrar em hipocalcémia sub-clínica pela altura do parto, o decurso normal deste pode sofrer algumas alterações. As contrações da musculatura lisa e estriada diminuem de intensidade e pode ocorrer atonias uterinas, inércia uterina e RP. Vários estudos indicam que vacas com hipocalcémia têm 2,5 a 6 vezes mais probabilidade de sofrer distócia do que vacas com calcémia normal (Correa *et al.*, 1993; Erb *et al.*, 1985). Além da hipocalcémia ser por si



só um factor de risco para RP, também parece predispor para distócia, que por sua vez é um factor de risco para RP (Correa *et al.*, 1993).

Ao analisar-se a média da calcémia das vacas que sofreram RP verificou-se que esta era relativamente baixa ( $7,62 \pm 1,16$  mg/dl). Existem no entanto outros factores de risco, como sendo, o balanço energético negativo que promove a imunodeficiência, níveis deficientes de vitamina E e selénio e traumas durante o parto. Os níveis imunitário da vaca são importantes para a perda de conexão entre a componente materna e fetal da placenta e uma etapa fundamental, ainda antes do parto, parece estar associada a uma acção e hidrólise do colagénio exercida pelos neutrófilos e macrófagos nos placentomas (Horta, 2000).

Quando se analisaram as doenças entre si verificou-se uma associação entre RP e metrite ( $p < 0,05$ ) que está de acordo com o encontrado na literatura (Lewis, 1997; Divers & Peek, 2008; Scott *et al.*, 2011; Koch, 2013). Ao permanecer no interior do útero uma grande quantidade de detritos orgânicos, não só constitui um factor de contaminação como ao entrar em necrose vai promover condições nutritivas para o desenvolvimento bacteriano (Opsomer & Kruif, 2009).

As prevalências encontradas na maior parte das doenças não sendo muito baixas não são preocupantes e estão próximas do que está descrito na literatura ( Leblanc, 2007; Dubuc, Duffield, Leslie, Walton, & LeBlanc, 2010) A exploração B apresentou o maior número de doenças, isto pode dever-se ao facto de não ter um veterinário em regime permanente pelo que os critérios de diagnóstico podem por vezes não ser muito bem interpretados e aplicados pelos trabalhadores.

Ao contrário do que aconteceu noutros estudos, ao administrarmos a vitamina D<sub>3</sub>, não se observaram efeitos adversos, como aumentar ainda mais o risco de hipocalcémia ou atrasá-la alguns dias como se verificou em alguns estudos (Littledike & Horst, 1982; Allsop & Pauli, 1985; Goff *et al.*, 1988).

## **6. Conclusão**

Neste estudo foi demonstrado que a administração de vitamina D<sub>3</sub> (Duphafrol D<sub>3</sub> 1000 ®) por via intramuscular entre os oito e os dois dias antes do parto corresponde a níveis mais elevados da calcémia das vacas leiteiras após o parto. Demonstrou-se também que

o uso simultâneo de dietas aniónicas e administração parentérica de vitamina D<sub>3</sub> têm uma acção sinérgica e mais acentuada no aumento da calcémia no pós-parto, do que usadas separadamente.

Verificou-se também que os valores médios da calcémia diminuem à medida que o número de lactações das vacas aumenta e que aparentemente a acção da vitamina D<sub>3</sub> é mais acentuada em vacas com maior número de lactações. No entanto este resultado necessita de confirmação através de mais estudos pois este efeito pode dever-se ao facto de animais mais velhos terem, em média, uma calcémia inferior e assim ser mais significativo o efeito ou então estas pequenas diferenças serem apenas devidas ao acaso. Demonstrou-se também que a ocorrência de retenção placentária aumenta com a idade de vaca e que é um factor de risco para o desenvolvimento de metrite.

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. Seria muito interessante também avaliar o possível efeito da vitamina D<sub>3</sub> na resposta imunitária da vaca no pós-parto e avaliar num sistema semi-intensivo se a exposição à luz solar aumenta a calcémia dos animais.

## Bibliografia

- Allsop, T. F., & Pauli, J. V. (1985). Failure of 25-hydroxycholecalciferol to prevent milk fever in dairy cows. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 13(1), 19–22.
- Angrimani, D. de S. R., Rui, B. R., Cruz, L. V. da, Romano, R. M., & Lopes, H. C. (2011). Retenção de Placenta em vacas e éguas: revisão de Literatura. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*, (16), 1–12.
- Bar, A., Perlman, R., & Sachs, M. (1985). Observation on the Use of 1 $\alpha$ -Hydroxyvitamin D3 in the Prevention of Bovine Parturient Paresis: The Effect of a Single Injection on Plasma 1 $\alpha$ -Hydroxyvitamin D3, 1,25-Dihydroxyvitamin D3, Calcium, and Hydroxyproline. *Journal of Dairy Science*, 68(8), 1952–1958.
- Biner, H. L., Arpin-Bott, M.-P., Loffing, J., Wang, X., Knepper, M., Hebert, S. C., & Kaissling, B. (2002). Human cortical distal nephron: distribution of electrolyte and water transport pathways. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 13(4), 836–847.
- Blaine, J., Chonchol, M., & Levi, M. (2014). Renal Control of Calcium, Phosphate, and Magnesium Homeostasis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 1–16.
- Bobe, G., Young, J. W., & Beitz, D. C. (2004). Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87(10), 3105–3124.
- Boros, S., Bindels, R. J. M., & Hoenderop, J. G. J. (2009). Active Ca<sup>2+</sup> reabsorption in the connecting tubule. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 458(1), 99–109.
- Borsberry, S., Dobson, H., 1989. Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds. *Vet. Rec.* 124, 217–219.
- Bronner, F. (2003). Mechanisms of intestinal calcium absorption. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88(2), 387–393.
- Brown, R. C., Care, A. D., & Pickard, D. W. (1978). Magnesium absorption from the rumen of sheep [proceedings]. *The Journal of Physiology*, 276, 62P–63P.
- Bruno, R. G. S., Texas, A., System, M., & a, W. T. (2010). Nutrition and Reproduction in Modern Dairy Cows, 51–56.
- Butler, W. R. (2000). Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 449–457.

- Capen, C. C., Cole, C. R., & Hibbs, J. W. (1966). The pathology of hypervitaminosis D in cattle. *Pathologia Veterinaria*, 3(4), 350–378.
- 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), 7001–13.
- Chapinal, N., Carson, M. E., LeBlanc, S. J., Leslie, K. E., Godden, S., Capel, M., ... Duffield, T. F. (2012). The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. *Journal of Dairy Science*, 95(3), 1301–9.
- Correa, M. T., Erb, H., & Scarlett, J. (1993). Path analysis for seven postpartum disorders of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 76(5), 1305–1312.
- Daniel, R. C. (1983). Motility of the rumen and abomasum during hypocalcaemia. *Canadian Journal of Comparative Medicine (Gardenvale, Quebec)*, 47(3), 276–280.
- 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.
- DeGroot, M. A., Block, E., & French, P. D. (2010). Effect of prepartum anionic supplementation on periparturient feed intake, health, and milk production. *Journal of Dairy Science*, 93(11), 5268–5279.
- Divers, T. J., & Peek, S. F. (2008). *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*. (S. Elsevier, Ed.) (2° ed., p. 686). Penny Rudolph.
- Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S., & LeBlanc, S. J. (2010). Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5764–5771.
- Erb, H. N., Smith, R. D., Oltenacu, P. A., Guard, C. L., Hillman, R. B., Powers, P. a, ... White, M. E. (1985). Path model of reproductive disorders and performance, milk fever, mastitis, milk yield, and culling in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 68(12), 3337–3349.
- Goff, J. P. (2006). Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders. *Animal Feed Science and Technology*, 126(3-4), 237–257.
- Goff, J. P. (2008). The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Veterinary Journal*, 176(1), 50–57.
- Goff, J. P. (2014). Calcium and Magnesium Disorders. *Veterinary Clinics of NA: Food Animal Practice*, 30(2), 359–381.

- Goff, J. P., & Horst, R. L. (1993). Oral administration of calcium salts for treatment of hypocalcemia in cattle. *Journal of Dairy Science*, *76*(1), 101–108.
- Goff, J. P., & Horst, R. L. (1997). Effects of the addition of potassium or sodium, but not calcium, to prepartum ratios on milk fever in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *80*(1), 176–186.
- Goff, J. P., & Horst, R. L. (2003). Role of acid-base physiology on the pathogenesis of parturient hypocalcaemia (milk fever)--the DCAD theory in principle and practice. *Acta Veterinaria Scandinavica. Supplementum*, *97*, 51–56.
- Goff, J. P., Horst, R. L., Beitz, D. C., & Littledike, E. T. (1988). Use of 24-F-1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> to prevent parturient paresis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *71*(5), 1211–1219.
- Goff, J. P., Horst, R. L., Jardon, P. W., Borelli, C., & Wedam, J. (1996). Field trials of an oral calcium propionate paste as an aid to prevent milk fever in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *79*(3), 378–383.
- Goff, J. P., Horst, R. L., Littledike, E. T., Boris, A., & Uskokovic, M. R. (1986). Bone resorption, renal function and mineral status in cows treated with 1,25 dihydroxycholecalciferol and its 24-fluoro analogues. *The Journal of Nutrition*, *116*(8), 1500–1510.
- Goff, J. P., Reinhardt, T. A., & Horst, R. L. (1995). Milk fever and dietary cation-anion balance effects on concentration of vitamin D receptor in tissue of periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *78*(11), 2388–2394.
- Goff, J. P., Reinhardt, T. A., & Horst, R. L. (1989). Recurring hypocalcemia of bovine parturient paresis is associated with failure to produce 1,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology*, *125*(1), 49–53.
- Goings, R. L., Jacobson, N. L., Beitz, D. C., Littledike, E. T., & Wiggers, K. D. (1974). Prevention of parturient paresis by a prepartum, calcium-deficient diet. *Journal of Dairy Science*, *57*(10), 1184–1188.
- Green, H. B., Horst, R. L., Beitz, D. C., & Littledike, E. T. (1981). Vitamin D metabolites in plasma of cows fed a prepartum low-calcium diet for prevention of parturient hypocalcemia. *Journal of Dairy Science*, *64*(2), 217–226.
- Groenestege, W. M. T., Hoenderop, J. G., van den Heuvel, L., Knoers, N., & Bindels, R. J. (2006). The epithelial Mg<sup>2+</sup> channel transient receptor potential melastatin 6 is regulated by dietary Mg<sup>2+</sup> content and estrogens. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, *17*(4), 1035–1043.
- Haussler, M. R., Whitfield, G. K., Kaneko, I., Haussler, C. A., Hsieh, D., Hsieh, J. C., & Jurutka, P. W. (2013). Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcified Tissue International*, *92*(2), 77–98.

- Henry, H. L. (2011). Regulation of vitamin D metabolism. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(4), 531–541.
- Hewison, M. (2010). Vitamin D and the intracrinology of innate immunity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 321(2), 103–111.
- Hibbs, J. W., & Conrad, H. R. (1976). Milk fever in dairy cows. VII. Effect of continuous vitamin D feeding on incidence of milk fever. *Journal of Dairy Science*, 59(11), 1944–1946.
- Hoenderop, J. G. J., Nilius, B., & Bindels, R. J. M. (2005). Calcium absorption across epithelia. *Physiological Reviews*, 85(1), 373–422.
- Hoorn, E. J., & Zietse, R. (2013). Disorders of calcium and magnesium balance: A physiology-based approach. *Pediatric Nephrology*, 28(8), 1195–1206.
- Horst, R. L., Goff, J. P., & Reinhardt, T. A. (1990). Advancing age results in reduction of intestinal and bone 1,25-dihydroxyvitamin D receptor. *Endocrinology*, 126(2), 1053–1057.
- Horst, R. L., Goff, J. P., & Reinhardt, T. A. (2005). Adapting to the transition between gestation and lactation: Differences between rat, human and dairy cow. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 10(2), 141–156.
- Horst, R. L., & Jorgensen, N. A. (1982). Elevated plasma cortisol during induced and spontaneous hypocalcemia in ruminants. *Journal of Dairy Science*, 65(12), 2332–2337.
- Horst, R. L., & Littledike, E. T. (1979). Assay for vitamin D<sub>2</sub> and vitamin D<sub>3</sub> in plasma of dairy cows: changes after massive dosing of vitamin D<sub>3</sub>. *Journal of Dairy Science*, 62(11), 1746–1751.
- Horta, A. E. M. (2000). Etiopatogenia e terapêutica da retenção placentária nos bovinos. In 7as Jornadas Internacionales de Reproducción Animal (pp. 181–192). Murcia.
- House, W. A., & Bell, A. W. (1993). Mineral accretion in the fetus and adnexa during late gestation in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 76(10), 2999–3010.
- Hymøller, L., & Jensen, S. K. (2010). Vitamin D<sub>3</sub> synthesis in the entire skin surface of dairy cows despite hair coverage. *Journal of Dairy Science*, 93(5), 2025–2029.
- Jablonski, N. G., & Chaplin, G. (2012). Human skin pigmentation, migration and disease susceptibility. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1590), 785–792.
- Jawor, P. E., Huzzey, J. M., LeBlanc, S. J., & von Keyserlingk, M. a G. (2012). Associations of subclinical hypocalcemia at calving with milk yield, and feeding, drinking, and standing behaviors around parturition in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 95(3), 1240–8.

- Jonsson, N. N., & Daniel, R. C. (1997). Effects of hypocalcaemia on blood flow to the ovaries of the sheep. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin. Reihe A*, 44(5), 281–287.
- Kemmis, C. M., Salvador, S. M., Smith, K. M., & Welsh, J. (2006). Human mammary epithelial cells express CYP27B1 and are growth inhibited by 25-hydroxyvitamin D-3, the major circulating form of vitamin D-3. *The Journal of Nutrition*, 136(4), 887–892.
- Kimura, K., Reinhardt, T. A., & Goff, J. P. (2006). Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 89(7), 2588–2595.
- Koch, G. M. S. (2013). Incidência e Consequências da Hipocalcémia Subclínica no Pós-Parto de Vacas Leiteiras. *Tese de mestrado*. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária/UTL.
- Kolek, O. I., Hines, E. R., Jones, M. D., LeSueur, L. K., Lipko, M. A., Kiela, P. R., Ghishan, F. K. (2005). 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 upregulates FGF23 gene expression in bone: the final link in a renal-gastrointestinal-skeletal axis that controls phosphate transport. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289(6), G1036–G1042.
- Kovács, S., Wilkens, M. R., & Liesegang, A. (2015). Influence of UVB exposure on the vitamin D status and calcium homeostasis of growing sheep and goats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99, 1–12.
- Leblanc, S. (2007). Prevention of Postpartum Uterine Disease. *WCDS Advances in Dairy Technology*, 19, 145–155.
- Lieben, L., Carmeliet, G., & Masuyama, R. (2011). Calcemic actions of vitamin D: Effects on the intestine, kidney and bone. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 25(4), 561–572.
- Lippolis, J. D., Reinhardt, T. A., Sacco, R. A., Nonnecke, B. J., & Nelson, C. D. (2011). Treatment of an intramammary bacterial infection with 25-hydroxyvitamin D 3. *PLoS ONE*, 6(10), 1–7.
- Littledike, E. T., & Goff, J. (1987). Interactions of calcium, phosphorus, magnesium and vitamin D that influence their status in domestic meat animals. *Journal of Animal Science*, 65(6), 1727–1743.
- Lo, C. W., Paris, P. W., Clemens, T. L., Nolan, J., & Holick, M. F. (1985). Vitamin D absorption in healthy subjects and in patients with intestinal malabsorption syndromes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 42(4), 644–649.
- Loffing, J., Loffing-Cueni, D., Valderrabano, V., Kläusli, L., Hebert, S. C., Rossier, B. C., Kaissling, B. (2001). Distribution of transcellular calcium and sodium transport pathways along mouse distal nephron. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 281(6), F1021–F1027.

- Martig, J., & Mayer, G. P. (1973). Diminished hypercalcemic response to parathyroid extract in prepartum cows. *Journal of Dairy Science*, 56(8), 1042–1046.
- Martinez, N, Sinedino, L D P, Bisinotto, R S, Ribeiro, E S, Gomes, G C, Lima, F S Greco, L F, Risco, C A, Galvão, K N, Taylor-Rodriguez, D, Driver, J P, Thatcher, W W, Santos, J. E. P. (2014). Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(2), 874–87.
- Martín-Tereso, J., & Martens, H. (2014). Calcium and Magnesium Physiology and Nutrition in Relation to the Prevention of Milk Fever and Tetany (Dietary Management of Macrominerals in Preventing Disease). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 30(3), 643–670.
- Martín-Tereso, J., & Verstegen, M. W. (2011). A novel model to explain dietary factors affecting hypocalcaemia in dairy cattle. *Nutrition Research Reviews*, 24(02), 228–243.
- Mateus, L., & Lopes da Costa, L. (2002). Peripartum blood concentrations of calcium , phosphorus and magnesium in dairy cows with normal puerperium or puerperal endometritis. Concentrações sanguíneas de cálcio , fósforo e magnésio no periparto de vacas leiteiras com puerpério normal ou com endometrite puerperal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 97, 35–38.
- Mccollum, B. E. V., Simmons, N., Becker, J.E. & Shipley, P.G. (1922). Studies on Experimental Rickets. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. LIII, N° 2.
- Mulligan, F. J., O’Grady, L., Rice, D., & Doherty, M. L. (2006). A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow. *Animal Reproduction Science*, 96(3-4), 331–353.
- Nelson, C. D., Nonnecke, B. J., Reinhardt, T.A., Waters, W. R., Beitz, D. C., & Lippolis, J. D. (2011). Regulation of mycobacterium-specific mononuclear cell responses by 25-hydroxyvitamin d3. *PLoS ONE*, 6(6).
- Nelson, C. D., Reinhardt, T.A., Thacker, T. C., Beitz, D. C., & Lippolis, J. D. (2010). Modulation of the bovine innate immune response by production of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) in bovine monocytes. *Journal of Dairy Science*, 93(3), 1041–1049.
- Nelson, C. D., Reinhardt, T. A., Beitz, D. C., & Lippolis, J. D. (2010). In Vivo activation of the intracrine vitamin D pathway in innate immune cells and mammary tissue during a bacterial infection. *PLoS ONE*, 5(11), 1–7.
- Nelson, C. D., Reinhardt, T. A., Lippolis, J. D., Sacco, R. E., & Nonnecke, B. J. (2012). Vitamin D signaling in the bovine immune system: A model for understanding human vitamin D requirements. *Nutrients*, 4(3), 181–196.



- Oetzel, G. R. (1996). Calcium chloride gel treatment of parturient dairy cows: effect on hypocalcemia and parturient diseases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 209(5), 958–961.
- Oetzel, G. R. (2011). An update on hypocalcemia on dairy farms. *Proceedings of the Four-State Dairy Nutrition and Management Conference*, 80–85.
- Opsomer, G., & Kruif, A. de. (2009). Metritis and endometritis in high yielding dairy cows. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 78, 83–88.
- Peek, S. F., Divers, T. J., Guard, C., Rath, a, & Rebhun, W. C. (2000). Hypokalemia, muscle weakness, and recumbency in dairy cattle. *Veterinary Therapeutics : Research in Applied Veterinary Medicine*, 1(4), 235–244.
- Pehrson, B., Svensson, C., & Jonsson, M. (1998). A comparative study of the effectiveness of calcium propionate and calcium chloride for the prevention of parturient paresis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 81(7), 2011–2016.
- Pérez, A. V., Picotto, G., Carpentieri, A. R., Rivoira, M. a., Peralta López, M. E., & Tolosa De Talamoni, N. G. (2008). Minireview on regulation of intestinal calcium absorption: Emphasis on molecular mechanisms of transcellular pathway. *Digestion*, 77(1), 22–34.
- Radostits, O. M., Gay, O. M., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (2007). Metabolic diseases. In *Veterinary Medicine*, Tenth edition (pp. 1613-1688). Edinburg: Saunders Elsevier.
- Rajala-Schultz, P. J., Gröhn, Y. T., & McCulloch, C. E. (1999). Effects of milk fever, ketosis, and lameness on milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 82(2), 288–294.
- Ram, L., Schonewille, J. T., Martens, H., Van't Klooster, A.T., & Beynen, A.C. (1998). Magnesium absorption by wethers fed potassium bicarbonate in combination with different dietary magnesium concentrations. *Journal of Dairy Science*, 81(9), 2485–2492.
- Reilly, R. F., & Ellison, D. H. (2000). Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology, and molecular anatomy. *Physiological Reviews*, 80(1), 277–313.
- 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.
- Reinhardt, T. A., Lippolis, J. D., McCluskey, B. J., Goff, J. P., & Horst, R. L. (2011). Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Veterinary Journal*, 188(1), 122–124.
- Risco, C.A., Reynolds, J.P., Hird, D., 1984. Uterine prolapse and hypocalcaemia in dairy cows. *J. Am. Vet Med. Assoc.* 185, 1517–1519.

- Roche, J. R., Friggens, N. C., Kay, J. K., Fisher, M. W., Stafford, K. J., & Berry, D. P. (2009). Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science*, *92*(12), 5769–5801.
- Rude, R. K. (1998). Magnesium deficiency: a cause of heterogenous disease in humans. *Journal of Bone and Mineral Research*, *13*(4), 749–758.
- Sattler, N., Fecteau, G., Couture, Y., & Tremblay, A. (2001). Évaluation des Équilibres Potassiques Chez La Vache Laitière Et Étude De Ses Variations Journalières Et Selon Le Stade De Production. *Canadian Veterinary Journal*, *42*(2), 107–115.
- Schröder, B., Rittmann, I., Pfeffer, E., & Breves, G. (1997). In vitro studies on calcium absorption from the gastrointestinal tract in small ruminants. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, *167*(1), 43–51.
- Scott, P. R., Penny, C. D., & Macrae, A. I. (2011). *Cattle Medicine* (1st ed.). Manson Publishing.
- Silver, J., & Naveh-Many, T. (2012). FGF23 and the parathyroid. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *728*, 92–99.
- Stevenson, J. S., & Call, E. P. (1988). Reproductive disorders in the periparturient dairy cow. *Journal of Dairy Science*, *71*(9), 2572–2583.
- Suzuki, Y., Landowski, C. P., & Hediger, M. a. (2008). Mechanisms and regulation of epithelial Ca<sup>2+</sup> absorption in health and disease. *Annual Review of Physiology*, *70*, 257–271.
- Teti, A., & Zallone, A. (2009). Do osteocytes contribute to bone mineral homeostasis? Osteocytic osteolysis revisited. *Bone*, *44*(1), 11–16.
- Thihsing-Hansen, T., Jørgensen, R. J., & Østergaard, S. (2002). Milk fever control principles: a review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *43*(1), 1–19.
- Tsiaras, W. G., & Weinstock, M. A. (2011). Factors influencing vitamin d status. *Acta Dermato-Venereologica*, *91*(2), 115–124.
- Ward, G., Harbers, L. H., & Blaha, J. J. (1979). Calcium-containing crystals in alfalfa: their fate in cattle. *Journal of Dairy Science*, *62*(5), 715–722.
- Whipple, D. L., & Horst, R. L. (2001). Modulation of Mycobacterium bovis-Specific Responses of Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cells by 1, 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Blood*, *8*(6), 1204–1212.
- Wilkens, M. R., Kunert-Keil, C., Brinkmeier, H., & Schröder, B. (2009). Expression of calcium channel TRPV6 in ovine epithelial tissue. *Veterinary Journal*, *182*(2), 294–300.

- Wilkens, M. R., Oberheide, I., Schröder, B., Azem, E., Steinberg, W., & Breves, G. (2012). Influence of the combination of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and a diet negative in cation-anion difference on peripartal calcium homeostasis of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95(1), 151–64.
- Williams, J. A. (2001). Intracellular signaling mechanisms activated by cholecystinin-regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells. *Annu Rev Physiol*. 2001;63:77-97.

## **Anexo 1 – Relatório de actividades de estágio**

O presente relatório tem como objetivo apresentar as actividades desenvolvidas durante o estágio curricular que foi dividido em três momentos. No período de 15 de setembro de 2014 a 15 de Dezembro de 2014 acompanhei o Professor George Stilwell nas aulas curriculares da disciplina de Clínica de Espécies Pecuárias da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa que integra no plano de trabalho: saídas de campo com pequenos grupos de alunos do 5º ano para explorações de vacas de leite e de carne e explorações de cabras de leite na área da grande Lisboa, Azambuja e Santarém. Ao longo do estágio acompanhámos três explorações de bovinos de leite em particular e visitámos periodicamente uma exploração de bovinos de carne e uma explorações de caprinos de leite. Durante o estágio desenvolveram-se actividades que integram as diversas áreas de medicina de ruminantes: clínica e cirurgia, manejo, anestesiologia, patologia podal, reprodução e obstetrícia, diagnósticos de gestação, por vezes, com recurso à imagiologia.

De 1 a 30 de janeiro acompanhei o Dr. João Camejo, veterinário residente, na exploração de bovinos de carne JPMC, SA. Aqui pude acompanhar o manejo e gestão da exploração de bovinos de carne e a exploração de suínos. Nos bovinos de carne realizámos as seguintes actividades:

- Descorna de vitelos;
- Protocolos de vacinação e provas de tuberculinização;
- Detecção de cios;
- Protocolos de sincronização; Colocação de PRIDs;
- Inseminação artificial;
- Corte funcional de unhas em alguns novilhos;
- Colheite de sangue;

Na exploração de suínos pude acompanhar diversas actividades, tais como:

- Diagnósticos de gestação nas porcas;
- Colheita de sémen de varrascos;
- Preparação de doses inseminantes de sémen;
- Detecção de cios nas porcas e inseminação artificial;

- Corte de caudas nos leitões e corte dos caninos;
- Detecção de doenças respiratórias e entéricas em leitões.

De 1 a 28 de fevereiro acompanhei o Dr. José Alface, veterinário residente, na exploração de bovinos de leite da Fonte de Leite, SA. Aqui pude acompanhar o manejo e gestão da exploração de bovinos de leite. E das actividades acompanhadas realço:

- Protocolos de sincronização e detecção deaios;
- Dianóstico de gestação por palpação e por ecografia;
- Descorna e vacinação de vitelos;
- Tratamentos varios;
- Cirurgias (nomeadamente a deslocamento do abomaso e hérnia umbilical numa vitela).

## **Anexo 2. Resumo das Características do Medicamento (Duphafral D<sub>3</sub> 1000<sup>®</sup>)**

### **1. NOME DO MEDICAMENTO VETERINÁRIO**

DUPHAFRAL D<sub>3</sub> 1000

### **2. COMPOSIÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA**

Cada ml contém:

#### **Substância(s) ativa (s):**

Colecalciferol	1 000 000 UI
----------------	--------------

#### **Excipientes:**

Óleo de arachis	20 mg
Álcool benzílico	9 mg
Ácido cítrico	1 mg
Fosfato dissódico	5 mg
Polioxil 35 óleo de castor	275 mg
Propileno glicol	100 mg
Água para injectáveis	q.b.p. 1 ml

Para a lista completa de excipientes, ver secção 6.1.

### **3. FORMA FARMACÊUTICA**

Solução injetável para a administração intramuscular.

### **4. INFORMAÇÕES CLÍNICAS**

#### **4.1. Espécie (s) -alvo**

Bovinos.

#### **4.2. Indicações de utilização, especificando as espécies-alvo**

O medicamento veterinário está indicado na profilaxia da febre vitular, particularmente em:

- Vacas que sofreram anteriormente de febre vitular,
- Vacas leiteiras a partir do terceiro parto e com produções elevadas,
- Vacas em gestação e cuja alimentação apresenta concentrações não equilibradas em cálcio.

#### **4.3. Contraindicações**

Desconhecidas

#### **4.4. Advertências especiais**

Não existem

#### **4.5. Precauções especiais de utilização**

##### **Precauções especiais para utilização em animais**

Devem ser observadas precauções assépticas aquando da administração do produto.

##### **Precauções especiais que devem ser tomadas pela pessoa que administra o medicamento aos animais**

Não aplicável.

#### **4.6. Reações adversas (frequência e gravidade)**

Não se conhecem.

#### **4.7. Utilização durante a gestação, a lactação e a postura de ovos**

Não se registaram efeitos adversos aquando da utilização do medicamento veterinário durante a gestação e lactação.

#### **4.8. Interação medicamentosa e outras formas de interação**

Desconhecidas.

#### **4.9. Posologia e via de administração**

Por cada injeção intramuscular de 10 ml do medicamento veterinário é administrada uma dose de 10 milhões de UI de vitamina D<sub>3</sub>.

De modo a determinar o momento exacto da administração, tem de se considerar que o “período efectivo” é atingido 2 dias após a injeção e persiste 8 dias, durante os quais é prevenida a hipocalcémia.

Existem dois métodos de estabelecer o momento óptimo de administração:

A) Uma administração baseada numa estimativa individual e pessoal da data provável do parto.

B) Uma administração baseada numa abordagem estatística, mais apropriada para grandes explorações, quando uma estimativa individual e pessoal da data provável do parto não é possível.

*Método A:*

A injeção é administrada entre o 8º e 2º dia antes da data prevista para o parto (6º dia é o óptimo). Se o parto não ocorrer na data prevista, é administrada uma segunda injeção 8 dias após a primeira, altura em que o efeito da primeira injeção cessou.

*Método B:*

Para serem obtidos bons resultados, a média da duração do período de gestação na exploração tem que ser calculado. O grau de proteção depende do valor do desvio padrão da exploração, que normalmente oscila entre  $\pm 4-6$  dias da média da data do parto. Dentro deste desvio padrão é possível obter um grau de proteção de 90 a 99% contra a febre vitular.

Para se obterem estes resultados, é recomendado o seguinte procedimento: a 1ª injeção é administrada 8 dias antes da data calculada para o parto; uma 2ª injeção terá de ser administrada 8 dias mais tarde às vacas que ainda não pariram.

#### **4.10. Sobredosagem (sintomas, procedimentos de emergência, antídotos), (se necessário)**

Após administrações repetidas de doses elevadas de vitamina D<sub>3</sub> foi observada calcificação dos vasos sanguíneos.

#### **4.11. Intervalo (s) de segurança**

Carne e vísceras: 8 dias

### **5. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS**

O medicamento veterinário contém vitamina D<sub>3</sub> como a única substância ativa.

O medicamento veterinário regula o metabolismo do cálcio na vaca em gestação, durante o período crítico dos 10 dias anteriores ao parto.

### **6. INFORMAÇÕES FARMACÊUTICAS**

#### **6.1. Lista de excipientes**

Óleo de arachis

Álcool benzílico

Ácido cítrico

Fosfato dissódico

Polioxil 35 óleo de castor

Propileno glicol

Água para injetáveis

## **6.2. Incompatibilidades**

A maioria das vitaminas são sensíveis a substâncias oxidantes e/ou a alterações de pH. Assim, é recomendado não misturar com qualquer outro medicamento veterinário.

## **6.3. Prazo de validade**

3 Anos.

## **6.4. Precauções especiais de conservação**

Conservar a temperatura inferior a 25 °C

Conservar em local seco.

Proteger da luz.

## **6.5. Natureza e composição do acondicionamento primário**

Frasco de vidro tipo I, cor âmbar, de 10 ml.

## **6.6. Precauções especiais para a eliminação de medicamentos veterinários não utilizados ou de desperdícios derivados da utilização desses medicamentos**

Não aplicável

## **7. TITULAR DE AUTORIZAÇÃO DE INTRODUÇÃO NO MERCADO**

Laboratórios Pfizer, Lda.

Lagoas Park – Edifício 10

2740-271 Porto Salvo

## **8. NÚMERO (S) DE REGISTO DA AUTORIZAÇÃO DE INTRODUÇÃO NO MERCADO**

1899

## **9. DATA DA PRIMEIRA AUTORIZAÇÃO/RENOVAÇÃO DA AUTORIZAÇÃO**

02/05/1968

## **10. DATA DE REVISÃO DO TEXTO**



### Anexo 3. Tabela de dados da exploração A

NºVaca	Grupo	Lactações	Calcémia	P100 dias	1ª Inseminação	Nº inseminações	RP	Metrite	DA	Mastite	Cetose
433	T	2	8,42	5311	64	3	1	1	0	1	0
492	T	2	9,31	4380	76	1	0	0	0	0	0
509	T	2	8,58	4223	39	2	0	0	0	0	0
510	T	2	8,87	5165	40	1	0	0	0	0	0
534	T	2	7,2	5054	70	1	0	0	0	0	0
576	T	2	7,76	NA	NA	NA	0	0	0	1	0
593	T	2	7,16	4300	NA	3	0	0	0	0	0
298	T	3	8,32	5600	NA	NA	0	0	0	0	0
355	T	3	10,6	3951	40	4	0	0	0	0	0
365	T	3	6,96	5367	48	2	0	0	0	0	0
470	T	3	7,86	5703	38	2	0	0	0	0	0
202	T	4	7,43	4600	NA	NA	1	0	0	0	1
217	T	4	6,71	6148	51	3	1	0	0	0	0
234	T	4	7,31	5253	48	2	0	0	0	0	0
244	T	4	7,25	5685	47	4	1	1	0	1	0
263	T	4	8,66	5495	61	2	0	0	0	0	0
290	T	4	8,38	4888	156	1	1	0	0	0	0
353	T	4	7,22	NA	NA	NA	0	0	0	1	0
111	T	5	9,31	4611	171	1	0	0	0	0	0
161	T	5	7,75	4187	NA	NA	0	0	0	0	0
229	T	5	8,04	4021	60	2	0	0	0	1	0
241	T	5	7,62	5536	50	2	0	0	0	1	0
127	T	6	8,12	NA	NA	NA	1	0	0	1	0
1446	T	6	6,56	NA	NA	NA	0	0	0	1	0

Continuação da Tabela: Tabela de dados da exploração A

472	C	2	8,11	4689	43	2	0	0	0	0	0
493	C	2	8,29	4698	37	1	0	0	0	0	0
531	C	2	6,98	4640	55	1	0	1	0	1	0
542	C	2	7,85	4827	84	2	0	0	0	0	0
557	C	2	7,8	4865	36	1	0	0	0	0	0
381	C	3	6,75	4630	55	5	0	1	0	0	0
394	C	3	7,82	5830	60	2	0	0	0	0	0
399	C	3	8,05	4905	53	2	0	0	0	1	0
424	C	3	5,68	5582	44	1	0	0	0	0	0
431	C	3	7,43	4944	54	3	0	0	0	0	0
430	C	3	7,4	4900	44	2	0	0	0	1	0
151	C	4	7,57	6116	104	1	1	0	0	0	0
172	C	4	5,14	5324	121	1	1	1	0	0	0
208	C	4	7,91	5524	76	3	1	1	0	0	0
262	C	4	7,24	5267	57	1	0	0	0	0	0
268	C	4	7,43	5609	59	5	1	0	0	0	0
303	C	4	8,14	4324	93	2	1	1	1	0	0
132	C	5	6,77	6072	51	2	0	0	0	0	0
155	C	5	5,8	5743	52	2	0	0	0	0	0
74	C	6	5,25	5663	81	2	1	0	0	0	0

Grupo teste (T), grupo controlo (C), calcémias em mg/dl, P100 (produção nos primeiros 100 dias em kg de leite), 1ª inseminação (intervalo até primeira inseminação pós-parto em dias), n° inseminações (número de inseminações necessárias até a vaca ficar novamente gestante), RP (retenção placentária) e DA (deslocamento do abomaso).

#### Anexo 4. Tabela de dados da exploração B

NºVaca	Grupo	Lactações	Calcemia	P100 dias	1ª Inseminação	Nº Inseminações	RP	Metrite	DA	Mastite	Cetose
1441	T	2	9,6	3180	88	5	1	1	0	0	0
1446	T	2	9,26	3755	70	3	1	1	0	0	0
1465	T	2	9,03	6066	65	2	0	0	0	0	0
1469	T	2	8,45	6529	70	2	0	1	1	0	0
1475	T	2	8,51	5864	88	4	0	0	0	0	0
1507	T	2	10,47	5170	40	1	0	0	0	0	0
2107	T	2	7,33	5136	55	3	0	0	1	0	1
136	T	3	6,26	4317	89	2	0	0	0	1	0
169	T	3	5,92	5977	100	1	0	1	0	0	0
225	T	3	8,24	5343	104	1	0	0	0	0	0
235	T	3	8,25	4857	91	3	0	0	0	0	0
239	T	3	6,9	4936	69	3	0	0	0	0	0
243	T	3	8,11	3762	NA	NA	0	0	0	0	0
310	T	3	8,93	5157	87	1	0	0	0	1	0
1313	T	3	8,6	5103	61	3	0	0	0	1	0
1353	T	3	7,89	3763	61	1	0	0	0	0	0
120	T	4	6,23	5035	71	5	1	0	0	1	0
9509	T	4	8,43	5417	70	4	0	0	0	0	0
9610	T	4	9,63	7084	87	2	0	1	0	1	0
9649	T	4	9,5	4649	65	1	0	0	0	0	0
9657	T	4	6,92	5313	58	2	0	1	0	0	0
9670	T	4	8,6	5801	89	3	0	0	0	0	0
7434	T	5	8,23	4923	77	1	0	1	0	1	0

Continuação da Tabela: Tabela de dados da exploração B

8511	T	5	8,27	5355	84	3	1	0	0	1	0
8621	T	5	8,33	4634	81	1	1	1	0	1	0
8664	T	5	7,02	4176	61	4	0	0	1	0	1
7411	T	6	11,11	NA	NA	NA	0	0	1	1	0
8510	T	6	8,42	5536	79	3	1	1	0	1	0
1373	C	2	7,58	5583	65	1	0	0	0	0	0
1395	C	2	8,43	3778	60	1	0	1	0	0	0
1408	C	2	8,27	5960	56	1	0	0	0	0	0
1470	C	2	7,85	5294	61	4	0	0	0	0	0
1476	C	2	8,29	5759	57	5	0	1	0	0	0
2170	C	2	8,72	5646	62	3	0	0	0	1	0
122	C	3	5,72	3302	53	1	0	0	0	1	0
141	C	3	5,84	2758	67	3	0	0	0	1	0
220	C	3	7,83	5009	68	2	0	0	0	0	0
242	C	3	8,48	3020	105	5	1	1	0	0	0
311	C	3	7,42	3766	55	4	1	0	0	1	0
1333	C	3	12,99	5399	58	1	0	1	0	0	0
1339	C	3	8,18	5443	61	2	1	0	0	0	0
1343	C	3	6,33	3983	69	1	0	1	0	1	0
9645	C	3	7,34	5611	51	1	0	1	0	0	0
8671	C	4	7,63	5149	60	2	0	1	0	1	0
9571	C	4	7,95	4590	100	1	0	0	0	0	1
9575	C	4	7,2	5068	64	3	0	0	0	0	0
9614	C	4	7,79	NA	NA	NA	0	0	0	1	0
9636	C	4	7,15	NA	NA	NA	0	0	0	1	0
9656	C	4	7,47	5127	91	3	1	1	0	1	0
9674	C	4	7,21	5494	67	1	0	1	0	1	0

---

**Continuação da Tabela: Tabela de dados da exploração B**

---

<b>2330</b>	C	NA	8,19	3792	116	1	0	1	0	0	0
-------------	---	----	------	------	-----	---	---	---	---	---	---

---

Grupo teste (T), grupo controlo (C), calcémias em mg/dl, P100 (produção nos primeiros 100 dias em kg de leite), 1ª inseminação (intervalo até primeira inseminação pós-parto em dias), nº inseminações (número de inseminações necessárias até a vaca ficar novamente gestante), RP (retenção placentária) e DA (deslocamento do abomaso).

---

### Anexo 5. Tabela de dados da exploração C

NºVaca	Grupo	Lactações	Calcémia	P100 dias	1ª inseminação	Nº inseminações	RP	Metrite	DA	Mastite	Cetose
75	T	2	8,21	4001	56	1	0	0	0	0	0
92	T	2	8,97	2401	110	1	1	0	1	0	1
97	T	2	8,42	458	NA	NA	0	0	1	0	0
112	T	2	8,97	3920	74	1	0	0	0	0	0
9108	T	2	7,33	NA	NA	NA	0	0	1	0	0
9164	T	2	7,23	4760	53	1	0	0	0	0	0
9173	T	2	8,5	4550	44	1	0	0	0	0	0
9181	T	2	8,42	4903	31	4	0	0	0	0	0
9203	T	2	9,3	3359	54	1	0	0	0	0	0
9229	T	2	7,45	4283	93	2	0	0	0	1	0
438	T	3	8,34	4180	57	2	0	0	0	0	0
8666	T	3	4,89	4954	74	1	0	1	0	0	0
8712	T	3	6,94	3266	56	1	0	0	0	0	0
8798	T	3	7,57	4528	73	2	0	0	0	0	0
8886	T	3	6,71	5300	74	1	0	0	0	0	1
8896	T	3	5,88	4254	76	3	0	0	0	0	0
8914	T	3	7,67	2006	NA	NA	0	0	1	0	0
8930	T	3	6,99	3995	75	3	0	1	0	1	0
8931	T	3	7,72	4623	71	4	1	1	0	0	0
8958	T	3	8,45	4450	68	4	0	0	0	0	0
8975	T	3	8,1	4670	76	1	0	0	0	0	0
8456	T	4	8,21	4247	62	4	1	0	0	0	0
8460	T	4	7,66	2499	57	3	0	0	1	0	0

Continuação da Tabela: Tabela de dados da exploração C

8566	T	4	8,47	5180	63	3	0	0	0	0	0
8590	T	4	5,46	5100	50	1	0	1	0	0	0
8604	T	4	8,64	3423	53	2	1	0	0	0	0
8764	T	4	6,59	778	NA	NA	0	1	0	0	1
8237	T	5	5,69	3769	NA	NA	0	0	0	1	0
8257	T	5	7,27	363	NA	NA	0	0	1	0	1
8321	T	5	7,81	5017	54	2	0	0	0	0	0
161	T	10	7,57	3690	90	2	0	0	0	0	0
74	C	2	6,01	4741	73	1	0	0	0	0	0
76	C	2	8,4	4950	56	2	0	0	0	0	0
101	C	2	7,92	4120	44	2	0	1	0	0	0
103	C	2	7,75	4784	76	1	0	0	0	0	0
9080	C	2	6,09	4639	61	3	0	0	0	0	0
9086	C	2	7,26	5219	68	1	0	0	0	0	0
9163	C	2	7,94	3872	52	3	1	0	0	0	0
450	C	3	7,27	4393	45	2	0	0	0	0	0
8677	C	3	6,49	5433	50	1	0	0	0	0	0
8727	C	3	8,27	4544	71	3	0	0	0	0	0
8833	C	3	7,38	5093	41	3	0	1	0	0	0
8885	C	3	7,13	4059	54	4	1	0	0	0	0
8949	C	3	5,74	4776	77	4	0	0	0	0	0
8959	C	3	7,1	4437	59	1	0	0	0	1	0
8956	C	3	7,45	3253	59	1	0	0	0	0	0
9011	C	3	6,97	4347	56	1	0	0	0	0	0
9030	C	3	7,29	4284	58	3	0	0	0	0	0
9048	C	3	6,09	3967	63	1	0	0	0	0	0

Continuação da Tabela: Tabela de dados da exploração C

<b>116</b>	C	4	4,01	4200	75	1	0	0	0	0	0
<b>8394</b>	C	4	6,21	4687	64	2	0	0	0	0	0
<b>8442</b>	C	4	7,4	656	NA	NA	1	0	0	0	0
<b>8480</b>	C	4	4,77	5024	44	4	1	0	0	0	0
<b>8498</b>	C	4	6,48	4657	57	2	0	1	0	0	0
<b>8704</b>	C	4	5,57	1804	NA	NA	0	0	1	0	0
<b>8721</b>	C	4	6,79	4283	40	3	0	0	0	0	0
<b>8102</b>	C	5	6	744	NA	NA	1	0	0	0	0
<b>8041</b>	C	6	7,32	4500	59	3	0	0	0	0	0

Grupo teste (T), grupo controlo (C), calcémias em mg/dl, P100 (produção nos primeiros 100 dias em kg de leite), 1ª inseminação (intervalo até primeira inseminação pós-parto em dias), n° inseminações (número de inseminações necessárias até a vaca ficar novamente gestante), RP (retenção placentária) e DA (deslocamento do abomaso).





## Projecto

### Ensaio clínico com Duphaftral D3 1000

#### Resumo:

- **Hipótese:** A administração de Duphaftral D<sub>3</sub> 1000 no ante-parto previne hipocalcémia e as suas consequências.
- Cinco explorações leiteiras. Dois grupos de estudo por exploração [grupo controlo (n=20) e grupo com administração de Duphaftral D<sub>3</sub> 1000 (n=20)]
- Vacas a partir do 2º parto inclusive (exclusão das novilhas da 1ª lactação)
- Colheita de sangue após o parto para medição da calcémia.
- Avaliação produtiva e clínica nos meses subsequentes.

#### Financiamento:

Zoetis Portugal

#### Equipa de investigação:

George Stilwell – responsável e orientador.

João Almeida - investigador

#### Desenho experimental

##### Grupo Duphaftral D3 1000

- administração de 10ml Duphaftral D<sub>3</sub> 1000, via intramuscular, seis dias antes da data prevista para o parto, mas admitindo ao estudo animais em que a administração de Duphaftral D<sub>3</sub> 1000 ocorreu entre os 8 e os 2 dias antes do parto (de acordo com o RCM). Administração de uma 2ª dose de Duphaftral D<sub>3</sub>1000, caso o intervalo entre a 1ª administração e o parto exceda os 8 dias (de acordo com o RCM).

- recolha de uma amostra de sangue entre as 6 e 24h após o parto

- congelação do soro para posterior envio para o laboratório e medição do cálcio total (protocolo de recolha e processamento do soro utilizado segue em anexo)
- medição da temperatura rectal diariamente nos 5 dias após o parto
- registo de ocorrência de doenças no pós-parto e seguimento da vaca até à primeira inseminação.
- registo da produção leiteira.

#### Grupo Controlo

- administração de placebo antes do parto segundo o protocolo referido para o grupo tratado.
- colheitas e registos segundo protocolo referido para grupo tratado

#### Motivos de exclusão do estudo

- não permanência na exploração durante todo o período de estudo (morte, refugo ou venda);
- administração de cálcio (oral ou injectável) antes da colheita da amostra de sangue;
- não cumprimento do intervalo de tempo para a recolha de amostra de sangue (por defeito ou por excesso, ou seja, recolha antes das 12h pós-parto ou após as 24h);
- não cumprimento do intervalo de tempo entre a administração de Duphaftral D<sub>3</sub> 1000 e o parto de acordo com o que está descrito no RCM (ex. vacas que pariram num período inferior às 48h após a administração de Duphaftral D<sub>3</sub> 1000; vacas que pariram num período superior aos 8 dias após a administração de Duphaftral D<sub>3</sub> 1000 sem que lhes tenha sido administrada uma 2ª dose).

#### Análise estatística:

Serão comparados os valores de calcémia entre os dois grupos e estudada a relação destes com a ocorrência de doenças do pós-parto, início de ciclicidade ovárica e produção de leite.

# Avaliação da calcémia ao parto

## Procedimento de colheita de amostras

### Animais a incluir:

vacas a partir do 2º parto, amostradas entre as 6 e as 24h pós-parto

#### A. Colheita de sangue venoso na veia jugular

1. Ligar adaptador e agulha ao tubo Monovette Serum
2. Colher 7,5ml de sangue (tubo bem cheio)
3. Agitar suavemente
4. Deixar coagular à temperatura ambiente durante 2 horas
5. Refrigerar durante 24 horas



#### B. Separação do soro:

1. Usar uma pipeta descartável para decantar soro (o mais límpido possível) para um tubo de 2ml
2. Congelar entre -18 e -20°C

**NOTA: Se o soro se apresentar avermelhado esta amostra é para eliminar.**



Contacto: João Almeida.  
Mail: [jpa18369@hotmail.com](mailto:jpa18369@hotmail.com)  
Telemóvel: 91 280 57 49



## PROJECTO VIT. D

### Registo Dados do Animal – Grupo CONTROLO

Número da Vaca: \_\_\_\_\_ Data nascimento: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_

Parto Dia: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Hora: \_\_\_\_: \_\_\_\_

Assistência ao Parto	Sem ajuda	Tracção mínima	Tracção moderada	Manobras obstétricas
Número de Crias		Sexo		Viabilidade das crias

Recolha de Sangue Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Hora: \_\_\_\_: \_\_\_\_

Administração de Cálcio Após o Parto		
Injectável	Tipo	Posologia
Oral	Tipo	Posologia
Observações		

Medição Temperatura Após o Parto (manhã)	
Dia 1	°C
Dia 2	°C
Dia 3	°C
Dia 4	°C
Dia 5	°C

Doenças Observadas no Pós Parto	Observações
Hipocalcémia	
Prolapso Uterino	
Retenção Placenta (12h)	
Mastite	
Metrite (até 10 dias pp)	
Endometrite (após 10 d pp)	
Cetose Subclínica	
Cetose Clínica	
Deslocação Abomaso	
Outra	



## PROJECTO VIT. D

### Registo Dados do Animal – Grupo TRATAMENTO

Número da Vaca: \_\_\_\_\_ Data nascimento: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_

Data Prevista para o parto	
Administração Prevista 1	6 dias antes da data prevista para o parto
Administração Prevista 2	8 dias após anterior se não ocorreu o parto
Administração EFECTIVA	

Parto Dia: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_: \_\_\_\_

Assistência ao Parto	Sem ajuda	Tracção mínima	Tracção moderada	Manobras obstétricas
Número de Crias		Sexo	Viabilidade das crias	

Recolha de Sangue Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_: \_\_\_\_

Administração de Cálcio Após o Parto		
Injectável	Tipo	Posologia
Oral	Tipo	Posologia
Observações		

Medição Temperatura Após o Parto (manhã)	
Dia 1	°C
Dia 2	°C
Dia 3	°C
Dia 4	°C
Dia 5	°C

Doenças Observadas no Pós Parto	Observações
Hipocalcémia	
Prolapso Uterino	
Retenção Placenta (12h)	
Mastite	
Metrite (até 10 dias pp)	
Endometrite (após 10 d pp)	
Cetose Subclínica	
Cetose Clínica	
Deslocação Abomaso	
Outra	

