



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Comparação de três protocolos de prevenção de hipocalcemia com bolos intra-ruminais de Cálcio em bovinos de leite.

Pedro Filipe Silva Castro

Orientador da Universidade de Évora: Professora
Doutora Sandra Branco

Orientador Externo: Dr. João Guilherme dos Santos
Paisana

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação de Natureza Científica

Évora, 2017

Esta dissertação não inclui as críticas e as sugestões feitas pelo júri

Agradecimentos

Ao Dr. João Paisana, pelos conhecimentos transmitidos, disponibilidade e companheirismo prestado, bem como pela confiança e responsabilidade depositada.

À Professora Doutora Sandra Branco, orientadora interna, pelo apoio e sugestões, não só durante o estágio curricular, mas também durante todo o meu percurso académico.

À Professora Doutora Elisa Bettencourt, pelos conselhos e apoio concedidos na preparação do estágio e colaboração prestada em todos os projetos realizados neste trajeto.

Ao Valdemar Sousa, pela amizade e colaboração, fundamental na realização do estágio bem como no estudo efetuado.

A toda a Agro-pecuária Afonso Paisana, pela hospitalidade, simpatia e colaboração.

À Vetlima, pela colaboração, quer no fornecimento do produto utilizado, quer na realização das análises laboratoriais.

Ao Rui e à Daniela, pelo apoio nos bons, e acima de tudo nos maus momentos, que apesar da distância, acompanharam sempre de perto esta longa caminhada.

À Maria, pelo companheirismo, cooperação e apoio concedido em todos os instantes.

Ao Bruno, companheiro de todas as horas, à Joana, Cláudio e Rúben pelas inúmeras horas de riso e bons momentos.

À minha prima Ana, por todos estes anos de amizade e companheirismo especialmente durante o período vivido em Évora.

Ao Nelito e à Madalena por me tratarem sempre como um filho.

Aos meus pais, pela educação que me deram, e pela possibilidade de realização deste curso, bem como aos meus irmãos, avós, tios e primos. Dedico-vos todo este trabalho.

Resumo

A hipocalcemia, apesar de ser um tema bastante estudado, ainda é uma afeção muito frequente no puerpério, provocando graves perdas económicas nas explorações.

Foram concebidos quatro grupos, constituídos por vacas múltíparas, de duas a seis lactações. Cada um deles foi sujeito a um procedimento diferente, utilizando bolos intra-ruminais de cálcio.

Foram recolhidas amostras serológicas para mensuração de cálcio total a todos os animais, no dia do parto ou na manhã seguinte quando este ocorreu durante a noite e nos dois dias seguintes, no período da manhã, após a ordenha.

No grupo Z (n=27), não foi administrado nenhum bolo intra-ruminal de cálcio. No grupo B1 (n=25), foi administrado um bolo intra-ruminal de cálcio após o parto. Ao grupo B11 (n=26), foram administrados dois bolos intra-ruminais de cálcio, um após o parto, e outro no dia seguinte, de manhã, após a ordenha. No grupo B2 (n=26), foram administrados dois bolos intra-ruminais de cálcio, após o parto.

Concluiu-se que não existem diferenças significativas entre grupos ($p= 0,986$) para os níveis de cálcio plasmático total embora, dentro de cada grupo, sejam significativas ($p=0,000$).

Palavras-chave: Hipocalcemia; Cálcio; Bovikal; Bovinos de leite; Prevenção

Evaluation of three hypocalcemia prevention protocols with intra-ruminal bolus of calcium in dairy cattle.

Abstract

Hypocalcemia, despite being a topic widely studied, it is still a very common pathology in the puerperium, causing serious economic losses in holdings.

Four groups were designed, each consisting of twenty-six cows, multiparous, from two to six lactations. Each one of them was subject to a different procedure, using intra-ruminal bolus of calcium. Serological samples were collected for measurement of total calcium from all animals, after delivery and the next two days, in the morning, after the milking.

In the group z (n=27), no intra-ruminal bolus of calcium was given. In group b1 (n=25), one intra-ruminal bolus of calcium was given after delivery. To the group b11 (n=26), two intra-ruminal calcium bolos were administered, one after delivery and the other the next day, in the morning after milking. In group b2 (n=26), two intra-ruminal calcium bolos were administered, both after delivery.

It was concluded that there are no significant differences between groups (P=0,986) for total plasma calcium levels although, within each group, it is significant (P=0,000).

Key words: Hypocalcemia; Calcium; Bovikalc; Dairy cattle; Prevention

Índice Geral

| | |
|--|------|
| Agradecimentos..... | I |
| Resumo..... | II |
| Abstract..... | III |
| Índice de figuras..... | VI |
| Índice de gráficos..... | VII |
| Índice de tabelas..... | VIII |
| Lista de abreviaturas..... | IX |
| Lista de símbolos..... | XI |
| Preâmbulo..... | 1 |
| Caracterização da exploração..... | 2 |
| I. Revisão bibliográfica..... | 3 |
| 1 Metabolismo do cálcio..... | 3 |
| 1.1 Homeostasia do cálcio..... | 3 |
| 1.2 Regulação e função da PTH..... | 4 |
| 1.3 Regulação e função da vitamina D..... | 5 |
| 1.4 Regulação e função da calcitonina..... | 7 |
| 2 Fatores que afetam a regulação dos níveis de cálcio..... | 9 |
| 2.1 Magnésio..... | 9 |
| 2.2 Fósforo..... | 11 |
| 2.3 Potássio..... | 13 |
| 2.4 Alterações ácido-base..... | 14 |
| 2.5 Idade dos animais..... | 16 |
| 2.6 Estrogéneos..... | 16 |
| 2.7 Raça..... | 16 |
| 2.8 Condição corporal..... | 17 |
| 3 Hipocalcemia como predisposição para outras doenças..... | 17 |
| 3.1 Distócia..... | 17 |
| 3.2 Prolapso uterino..... | 18 |
| 3.3 Deslocamento de abomaso..... | 18 |
| 3.4 Retenção de membranas fetais..... | 19 |
| 3.5 Mastite..... | 20 |
| 3.6 Metrite e endometrite..... | 20 |

| | |
|---|----|
| 3.7 Cetose | 21 |
| 4 Sinais Clínicos | 23 |
| 4.1 Hipocalcemia subclínica..... | 23 |
| 4.2 Hipocalcemia clínica | 24 |
| 5 Diagnóstico | 24 |
| 6 Opções terapêuticas | 25 |
| 6.1 Administração intravenosa de cálcio..... | 25 |
| 6.2 Administração subcutânea de cálcio..... | 26 |
| 6.3 Administração intramuscular de cálcio | 26 |
| 7 Prevenção..... | 27 |
| 7.1 Dietas aniônicas | 27 |
| 7.2 Dietas reduzidas em cálcio | 28 |
| 7.3 Vitamina D e seus metabolitos | 28 |
| 7.4 Administração oral de cálcio | 29 |
| II. Trabalho experimental | 31 |
| 1 Introdução | 31 |
| 2 Objetivos..... | 32 |
| 3 Materiais e métodos | 32 |
| 3.1 Amostra | 32 |
| 3.2 Desenho experimental | 33 |
| 4 Resultados..... | 36 |
| 5 Discussão | 48 |
| 6 Conclusão..... | 50 |
| Bibliografia..... | 52 |
| Anexo I – Pressupostos da anova mista | 61 |
| Anexo II – Bovicalc® | 63 |
| Anexo III – Protocolo laboratorial para medição de ca total | 64 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Rótulo da embalagem do sequestrante de cálcio | 2 |
| Figura 2 – Ação da pth ao nível da membrana celular (Adaptado de Goff, 2014) | 5 |
| Figura 3 – Transporte transepitelial gastrointestinal de Ca (Martin-Tereso & Martens,2014) | 6 |
| Figura 4 – Metabolismo do Mg numa vaca de 700Kg de peso vivo com produção leiteira diária de 40Kg, digestibilidade aparente 20% (Martens & Schweigel, 2000) | 10 |
| Figura 5 – Consequências da hipocalcemia. ↓ - Diminuição da incidência, ↑- Aumento da incidência, RP- Retenção placentária, DA – Deslocamento do abomaso, TGI – Trato gastrointestinal (Esquema adaptado de Mulligan <i>et al.</i> , 2006 referido por Almeida 2015). | 23 |
| Figura 6 – Marcas auriculares e respetivo alicate de aplicação | 34 |
| Figura 7 – Animal do grupo B1 com marca auricular azul | 34 |
| Figura 8 – Centrífuga utilizada no processamento das colheitas de sangue..... | 35 |
| Figura 9 – Tubo com amostra de sangue após ter sido centrifugado, já com o plasma separado no tubo eppendorf, identificado e pronto para seguir para laboratório | 35 |
| Figura 10 – Embalagem térmica de transporte das amostras para o laboratório..... | 35 |

Índice de gráficos

| | |
|---|----|
| Gráfico 1 – Perfis séricos de paratormona (PTH), calcitonina (CALC), cálcio (Ca) e 1,25(OH)2D3 ao longo do período péri-parto (-5 a 5 dias entre o parto). A tracejado estão representados animais com valores séricos de Ca 6,0 a 7,6 mg/dl e a traço contínuo os animais com 7,5 a 8,5 mg/dl (Rodriguez, 2016) | 8 |
| Gráfico 2 – Curvas fixas das concentrações séricas de Ca, Mg, P e K incluindo animais de todas as lactações nos 8 dias pós-parto por um modelo de análise de regressão aleatória (Tsiamadis <i>et al</i> , 2016)..... | 12 |
| Gráfico 3 – Efeito da administração intravenosa com 10.8g de Ca na concentração plasmática de cálcio em bovinos da raça <i>Jersey</i> com hipocalcemia clínica (Adaptado de Goff, 1999 referido por Oetzel, 2013)..... | 26 |
| Gráfico 4 – Distribuição dos animais constituintes da amostra em função da raça..... | 33 |
| Gráfico 5 – Valores médios de cálcio em cada momento de recolha..... | 38 |
| Gráfico 6 – Distribuição dos valores de cálcio de todos os grupos nos três momentos de recolha | 41 |
| Gráficos 7 e 8 – Medição média dos níveis de cálcio por grupo em cada momento de recolha, à esquerda o gráfico 7 representa a raça <i>Holstein</i> e à direita o gráfico 8 representa os animais <i>procross</i> | 44 |

Índice de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Valores séricos de referência a concentração de Ca total segundo Goff (2014) | 25 |
| Tabela 2 – Distribuição dos animais que compõem a amostra pelos diferentes grupos e respectivo nº de lactação e raça | 33 |
| Tabela 3 – Descritivos das médias de cálcio por grupo em cada momento de recolha, bem como o desvio padrão de cada situação..... | 37 |
| Tabela 4 – Testagem de diferenças entre grupos e intragrupo em cada momento de medição de cálcio. Type III sum of squares – somatório dos quadrados, df – graus de liberdade, f – estatística de teste e sig.- significância ou valor p..... | 39 |
| Tabela 5 – Diferenças de médias de cálcio entre os momentos de medição | 39 |
| Tabela 6 – Médias de cálcio para cada raça, em cada momento de recolha tendo em conta o grupo, bem como o desvio padrão de cada situação | 43 |
| Tabela 7 – Testagem de diferenças entre grupos e intragrupo em cada momento de medição de cálcio (MMCálcio) para vacas <i>Holstein</i> e vacas <i>procross</i> . Type III sum of squares – somatório dos quadrados, df – graus de liberdade, f – estatística de teste e sig.- significância ou valor p | 45 |
| Tabela 8 – Comparações múltiplas entre momentos de medição de cálcio, em cada grupo, para animais <i>Holstein</i> e <i>procross</i> | 46 |

Lista de abreviaturas

AC – Adenilato ciclase

AMPC – Adenosina monofosfato cíclico

BEN – Balanço energético negativo

DA – Deslocamento de Abomaso

DCAD – Diferença catião-anião na dieta

GDP – Guanosina difosfato

DNA – Ácido desoxirribonucleico

HP – Hipocalcemia puerperal

IU – Unidades internacionais

M-CSF – Fator estimulante de colónias de macrófagos

min – Minuto

mmol – Milimole

mM – Milimolar

MS – Matéria Seca

NNP – Azoto não proteico

PTH – Paratormona

RE – Retículo endoplasmático

RNA – Ácido ribonucleico

RP – Retenção de placenta

SNC – Sistema nervoso central

TRPV-6 – “*Transient receptor potencial cation channel*”, canal iónico potencial do receptor transitório, subfamília V, número 6

VDR – Recetores da vitamina D

Vit. – Vitamina

1,25(OH)₂D - 1,25 di-hidroxivitamina D₃ (calcitriol)

25-OH Vit. D – 25 – hidroxivitamina D₃

Lista de símbolos

α – Alfa

β – Beta

γ – Gama

Ca – Cálcio

Ca_i – Cálcio ionizado

Ca⁺²- ião Cálcio

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

Cl - Cloro

Cl⁻¹- ião Cloro

K – Potássio

K⁺¹ – ião Potássio

H⁺ - Hidrogenião

Mg – Magnésio

Mg⁺⁺GTP- Magnésio guanosina trifosfato

Mg⁺⁺ATP – Magnésio Adenosina trifosfato

Mg⁺²- ião Magnésio

Na – Sódio

Na⁺¹- ião Sódio

P – Fósforo

PO₄⁻³- Fosfato

P_i – Fósforo ionizado

S- Enxofre

SO_4^{2-} - Sulfato

< - Menor que

Preâmbulo

O cálcio (Ca) é fundamental para a contração do músculo liso e esquelético, assim como também para a função imunitária, pelo que a hipocalcemia puerperal (HP), tem um impacto bastante considerável na performance produtiva do animal, aumentando a probabilidade da incidência de algumas doenças, como cetose, deslocamento de abomaso, mastite, metrite e fígado gordo, afetando também a fertilidade da vaca (Goff, 2014).

As alterações fisiológicas induzidas no animal, pela entrada no período seco e a diminuição da capacidade de ingestão, devido ao crescimento do feto, são fatores que potenciam a hipocalcemia puerperal (HP). Esta é considerada uma patologia metabólico-nutricional, onde há um decréscimo na concentração de Ca plasmático até às 72 horas pós-parto (Corbellini, 1998), pois em condições normais, o nadir da concentração plasmática de Ca deverá ser atingido até às 24 horas pós-parto (Goff, 2014).

Na HP é necessário distinguir a hipocalcemia clínica da subclínica. Se por um lado, a HP clínica é uma patologia dispendiosa por cada caso clínico, por outro, a HP subclínica, dada a sua subjetividade e dificuldade de diagnóstico, tem uma expressão superior na economia da exploração. Supondo um efetivo de 2000 animais, com uma incidência anual de hipocalcemia subclínica de 2%, esta representa um custo anual para a exploração, de cerca de 12.000 US\$ (Oetzel, 2015).

Uma vez que a hipocalcemia é uma consequência de uma falha fisiológica do organismo, na adaptação ao pós-parto, a correção artificial da calcemia, através de soluções intravenosas, deve ser somente utilizada em casos graves de HP clínica. Caso contrário, o efeito pode ser o oposto ao desejado, interferindo negativamente na homeostasia do Ca, de maneira que a solução ideal é a prevenção, utilizando estratégias como suplementação em Ca, ou planos nutricionais formulados especificamente para animais em pré-parto, como dietas aniónicas, ou com teores reduzidos de Ca (Martín-Tereso e Martens, 2014).

O presente trabalho decorreu na exploração agro-pecuária Afonso Paisana, em Foros de Salvaterra, entre setembro de 2016 e janeiro de 2017, tendo como objetivo verificar a eficácia da administração do bovicalc® (cada bolo contém 43g de cálcio onde 71% provém do cloreto de cálcio e 29% do sulfato de cálcio, como mostra o anexo II) na prevenção de hipocalcemia, utilizando diferentes protocolos de administração.

Caracterização da exploração

A exploração onde foi realizado o presente estudo conta com cerca de 250 vacas em lactação, com uma média de 163 dias de lactação e uma produção média diária de 36 litros por animal. São realizadas duas ordenhas diárias, com um intervalo de 12 horas.

Desde 2012 que foi implementado um programa de “*crossbreeding*”, designado de *procross*, utilizando três raças de aptidão leiteira, a *Holstein-Frisia*, a *Montbeliard* e a Vermelha-Sueca.

O período voluntário de espera é de 45 dias, com um número médio de dias abertos de 124 dias. A idade à primeira inseminação fecundante, em novilhas, ronda os 423 dias.

O arraçamento dos animais é concebido tendo em conta a fase produtiva dos mesmos. A alimentação do grupo de animais no período seco e em fase de pré-parto (< 20 dias para a data prevista de parto), tem como base diferentes matérias-primas, tais como, palha, farinha de milho, soja, massa de cerveja, silagem de milho e um suplemento mineral. À mistura do grupo dos animais em fase de pré-parto é adicionada um quelante de Ca (Calfix®), cujo rótulo é apresentado na figura 1.

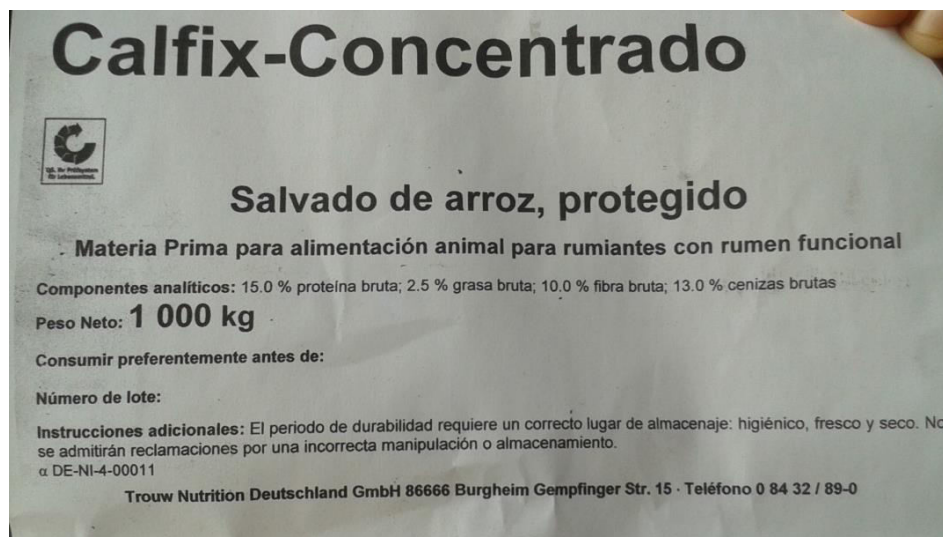


Figura 1- Rótulo da embalagem do quelante de cálcio.

I. Revisão bibliográfica

1. Metabolismo do cálcio

1.1 Homeostasia do cálcio

A concentração plasmática de cálcio total, numa vaca com cerca de 600 Kg, em condições normais, está entre os 8.5 e os 10 mg/dl ou 2.1 e 2.5 mmol/L, ou seja, na totalidade do plasma, existem 3g de Ca e cerca de 8 a 9g de Ca em todo o conteúdo extracelular (Goff, 2000), por outro lado, o esqueleto de um bovino contém cerca de 7.8 a 8.5 Kg de Ca. A fração biologicamente ativa de Ca é apenas a que se encontra sob a forma ionizada, cerca de 42-48%. Cerca de 50% do Ca está acoplado a proteínas como a albumina, e os restantes 2% a 8% formam complexos solúveis com aniões, como sulfato, bicarbonato, citrato e fosfato (Goff, 2014).

Com valores entre 5.5 e 8.0 mg/dl, consideramos que o animal está em hipocalcemia subclínica, sempre que a concentração plasmática de Ca total estiver abaixo de 5.5 mg/dl estamos perante uma hipocalcemia severa (Goff, 2014).

A probabilidade de hipocalcemia no parto aumenta com o número de lactações. Segundo Martín-Tereso e Martens (2014), os valores séricos de Ca diminuem abaixo de 8.1 mg/dl em cerca de 25% das novilhas, 41% em multíparas de segunda lactação e acima de 54 % em multíparas com 5 lactações.

As necessidades de Ca de um bovino de leite variam durante a lactação. No pós-parto são consumidos cerca de 1.7 a 2.3g de Ca por cada kg de colostro produzido, já para a produção de leite na restante lactação são consumidos cerca de 1.1g de Ca por kg de leite produzido (Goff, 2014), ou seja, numa vaca média produtora, que produza diariamente cerca de 25 L, são consumidos cerca de 28g de Ca por dia. Ao mesmo tempo, as perdas diárias de Ca pelas fezes são cerca de 5.0 a 7.0 g e pela urina 0.5 a 2g (Goff, 2000).

Conhecidos os níveis médios de Ca num bovino adulto, e relacionando com as exigências diárias em Ca a que é sujeito, facilmente se percebe que tem de existir um mecanismo de homeostasia e reposição de Ca que seja funcional e eficaz. Essa homeostase, pode ser realizada recorrendo a três fontes distintas: reabsorção óssea, absorção intestinal e reabsorção renal, apesar desta última via ser pouco significativa

(Goff, 2000). O funcionamento destes mecanismos dependem da ação endócrina, nomeadamente da paratormona (PTH) e da 1,25 dihidroxivitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) (Arioli & Corrêa, 1999).

Segundo Tsiamadis *et al* (2016) o grande problema da homeostasia do cálcio no período pós-parto, não está na falta de PTH, pois já foi demonstrado que os animais possuem quantidade suficiente desta hormona, mas numa inabilidade dos seus recetores responderem à sua presença.

1.2 Regulação e função da paratormona

A paratormona (PTH) é produzida por 4 glândulas paratiróides, transportada através do retículo endoplasmático rugoso e armazenada em grânulos secretores, (Arioli & Corrêa, 1999) e é a principal responsável pela resposta à hipocalcemia (Goff, 2014).

A concentração extracelular de Ca é determinada por recetores à superfície das células da paratiróide (Goff, 2014), recetores esses que têm a capacidade de se ligar ao Ca ionizado e regular a libertação de PTH.

A sua intervenção tem como alvos, o rim, onde vai melhorar a reabsorção de Ca^{2+} no túbulo distal e promover a produção de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Brown, 2013), e a fração óssea, agindo nos osteoblastos e nos osteócitos (Goff, 2014).

Em condições normais, ou seja com concentrações plasmáticas de Ca entre 8.0-10.0 mg/dl, os recetores de Ca à superfície da paratiróide, estão preenchidos, e assim a secreção de PTH mantém-se estável. Em caso de hipocalcemia os recetores ficam livres, e consequentemente há um aumento na libertação de PTH (Brown, 2013).

Os recetores da PTH são proteínas transmembranares que contactam com o líquido extracelular e com o interior da célula, sendo que a fração extracelular liga-se especificamente á PTH. A fração intracelular está associada a uma proteína G que por sua vez possui unidades α , β e γ . A porção α está associada a uma molécula de GDP, e normalmente está na forma inativa. Quando há ligação da PTH ao recetor, este altera a sua estrutura para a forma terciária, fazendo com que a porção α liberte a molécula de GDP e adquira Mg^{++} guanosina trifosfato (Mg^{++}GTP). Simultaneamente, a Mg^{++} adenosina trifosfato (Mg^{++}ATP) promove a separação da porção α do recetor da PTH, ligando-se a uma adenilato ciclase (AC), e este novo complexo por sua vez terá a capacidade de converter a Mg^{++}ATP em adenosina monofosfato cíclico (AMPc). O AMPc desempenhará

o papel de mensageiro, estimulando, entre outras vias, proteína cinases que irão restaurar os níveis de Ca extracelular, como ilustra a figura 2 (Goff, 2014).

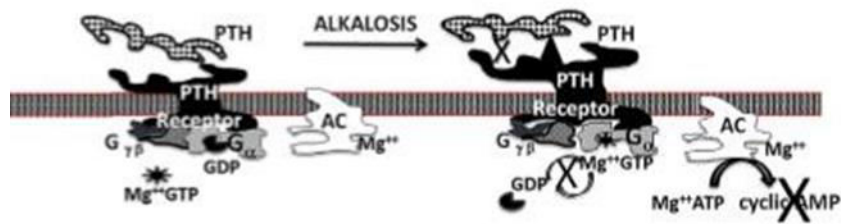


Figura 2 – Ação da PTH ao nível da membrana celular (Adaptado de Goff, 2014).

Como referido anteriormente, um dos locais de ação da PTH será o rim, promovendo a reabsorção de Ca. Em condições normais, as perdas urinárias rondam as 0,5g o que torna esta via insuficiente para restaurar os níveis de Ca (Goff, 2014), fazendo com que a reabsorção óssea seja uma das principais, senão a principal, via para repor a normocalcemia.

A maioria do Ca no osso encontra-se sob a forma de cristais, envolvidos numa matriz de colagénio, e apenas podem ser mobilizados por osteoclastos, uma vez que somente estes secretam as enzimas capazes de digerir a matriz de colagénio. Contudo, os osteoclastos, ao contrário dos osteoblastos, não possuem recetores de PTH, de modo que são os osteoblastos que os levam a iniciar a reabsorção óssea, produzindo citocinas como fator estimulante de colónias de macrófagos (M-CSF), e ativador do recetor do fator nuclear k-b ligante, às quais os osteoclastos são sensíveis (Goff, 2014).

1.3 Regulação e função da vitamina D

A vitamina D (Vit. D) desempenha um papel muito importante no metabolismo dos animais, sendo necessário não só apenas no metabolismo do cálcio mas promovendo também a formação de óxido nítrico, péptidos antimicrobianos e o desenvolvimento da glândula mamária (Almeida, 2015)

Existem duas formas de vitamina D nos animais, vit. D₂ e vit.D₃, as quais podem ser obtidas através da alimentação, uma vez que as forragens são ricas em vit. D₂, ou através de síntese endógena por exposição solar, e neste caso falamos de vit. D₃ (Wallis *et al*, 1958).

Uma vez na corrente sanguínea, a vit.D segue em direção ao fígado onde será hidroxilada no carbono 25 dando origem a 25-OH vit. D, sendo seguidamente libertada na corrente sanguínea. Esta é a forma de vitamina D maioritariamente presente na corrente sanguínea cujos níveis medimos normalmente num animal. Posteriormente, a 25-OH vit.

D chega ao rim, que no caso de estar estimulado pela PTH, é convertida em $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ por ação da enzima 1α -hidroxilase. A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ é libertada na corrente sanguínea e terá como destino o epitélio intestinal sendo reconhecida pelos receptores da Vit. D (VDR) que promoverão a absorção de Ca proveniente da dieta (Goff, 2014).

Teoricamente, como a concentração em Ca na dieta é maior que no interior das células da barreira intestinal, deveria ser razão suficiente para originar um gradiente eletroquímico que levasse à passagem do Ca pela membrana apical caso esta fosse permeável ao Ca, contudo não é o que se verifica. Assim, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, fará com que certas proteínas como as do canal iônico potencial do receptor transitório (TRPV-6), na membrana apical dos enterócitos, fiquem permeáveis ao Ca, formando como que canais para a sua passagem, do lúmen intestinal para o meio intracelular (Goff, 2014).

No meio intracelular, como representa a figura 2, o Ca necessita de se ligar a uma segunda vit. D (calbindina-D9K), que terá a função de auxiliar na passagem pelo citosol até à membrana basolateral. Como a concentração de Ca no meio extracelular é muito superior à do meio intracelular, é necessário recorrer a outra vit.D, assim como também a proteínas transportadoras de Ca dependentes de energia, como a Ca-ATPase, de forma a permitir o transporte contra o gradiente electroquímico, fazendo com que o Ca chegue à corrente sanguínea. A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ tem influência sobre as 3 vit. D anteriormente referidas, sendo contudo, um processo moroso, uma vez que a administração de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ só terá reflexo nos níveis de calbindina-D9K após cerca de 18 horas (Goff, 2014; Almeida, 2015).

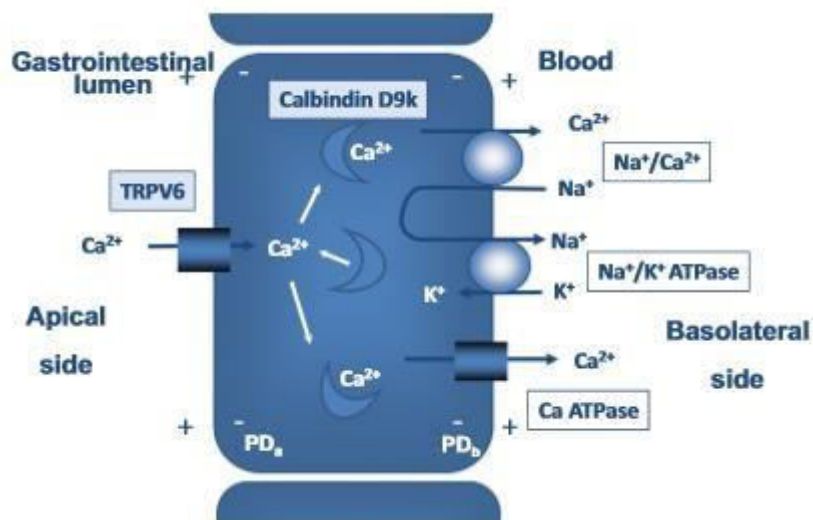


Figura 3 - Transporte transepitelial gastrointestinal de Ca (Martin-Tereso & Martens,2014)

A absorção intestinal de Ca não fica por aqui. Além do mecanismo anteriormente descrito, considerado como mecanismo ativo, existe outro ao qual chamamos mecanismo paracelular (Pérez *et al.*, 2008).

O mecanismo paracelular de absorção intestinal de Ca é independente da ação da vit.D. Baseia-se na passagem de Ca do lúmen intestinal para o fluido extracelular, por entre os enterócitos, ou seja, pelo espaço que virtualmente existe entre dois enterócitos, também designado de “*tight junctions*”. Este mecanismo estará sempre dependente da concentração de Ca na dieta, e será mais eficaz quanto mais rica for a dieta em Ca. Nos monogástricos, estima-se que 30% a 60% do Ca absorvido seja resultado deste mecanismo, contudo, nos ruminantes, é desconhecida a sua eficácia. Julga-se que nos ruminantes, com dietas pobres em Ca, o mecanismo ativo, ou seja, dependente de vit. D, seja o mais predominante, e em dietas ricas em Ca seja o mecanismo paracelular aquele que mais contribui para a absorção de Ca. (Goff, 2014)

1.4 Regulação e função da calcitonina

A calcitonina, produzida pelas células c da tiróide, ao contrário da PTH e da vit. D tem função hipocalcemiante, diminuindo assim a reabsorção óssea e aumentando as perdas urinárias de Ca (Murray *et al.*, 2008).

Os níveis séricos de calcitonina, no pós-parto, não parecem sofrer alterações consoante a concentração sérica de Ca, mas sim em função dos dias pós-parto, ou da concentração de PTH (Rodríguez *et al.*, 2016).

Rodríguez *et al.* (2016) observaram que quanto maior o grau de hipocalcemia subclínica no momento do parto e no segundo dia pós-parto, maior é a concentração sérica de calcitonina, que por sua vez, como se pode constatar pelo gráfico 1, parece acompanhar as variações séricas de PTH, existindo como que um efeito *feedback* da calcitonina sobre a produção de PTH. No entanto, este efeito não foi verificado em casos de hipocalcemia clínica. Uma explicação para este fenómeno pode ser o fato de que, como estas duas hormonas tem ações opostas, no caso da hipocalcemia clínica, apesar da ação da PTH, a concentração sérica de Ca é tão baixa que inibe a produção de calcitonina. Assim, o atraso entre a produção e a ação de PTH leva a que a calcitonina dificulte ainda mais a recuperação de um animal em hipocalcemia subclínica.

Uma solução para este problema pode ser a acidificação metabólica, através de uma dieta aniónica no pré-parto. A calcitonina parece ter maior atividade a um ph de cerca de

7.4. Por outro lado a acidose metabólica melhora a expressão dos recetores da PTH no rim, e como consequência aumenta a síntese de 1,25(OH)₂D, que por sua vez melhora a absorção intestinal de Ca (Rodríguez *et al.*, 2016).

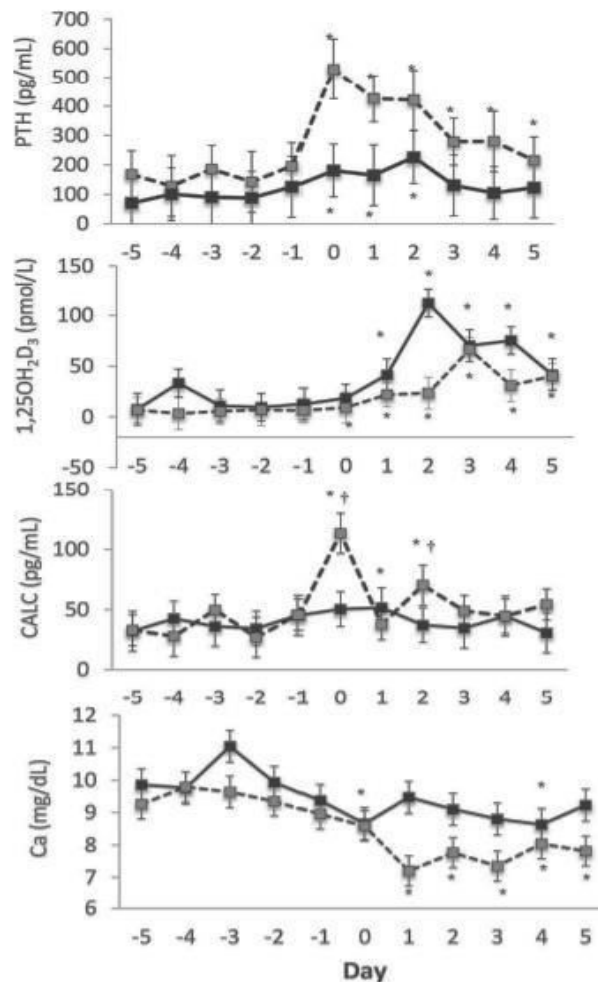


Gráfico 1 - Perfis séricos de paratormona (PTH), calcitonina (CALC), cálcio (Ca) e 1,25(OH)₂D₃ ao longo do período pré-parto (-5 a 5 dias entre o parto). A tracejado estão representados animais com valores séricos de Ca 6,0 a 7,6 mg/dl e a traço contínuo os animais com 7,5 a 8,5 mg/dl (Rodríguez, 2016).

2. Fatores que afetam a regulação dos níveis de Ca

2.1 Magnésio

O magnésio (Mg) é o 4º catião mais abundante no organismo. Está implícito em diversos mecanismos fisiológicos e bioquímicos como síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA), ativação de enzimas como ATPases, Kinases, fosfatases, e mais recentemente, alguns estudos alertam para a sua importância na regulação de sinapses na contração do músculo esquelético. Assim, alterações na homeostasia do magnésio como a hipomagnesiemia, implicam graves consequências para o animal, como redução da ingestão de alimento, diminuição da produção de leite, e nos casos mais severos, pode mesmo levar à morte (Martens & Schweigel, 2000)

Uma vaca leiteira com cerca de 700 Kg de peso vivo, possui cerca de 450 a 500 g de Mg, 60 a 70% está no osso, cerca de 1% está no espaço extracelular e o restante encontra-se no espaço intracelular. Em condições normais a concentração sérica de Mg deve estar entre 1.95 e 2.92 mg/dl (Martín-Tereso & Martens, 2014). Para que tal aconteça, a ingestão diária deve rondar os 0.2% a 0.3% da matéria seca (Corbellini, 1998).

Ao contrário do Ca, a homeostasia do Mg não depende do sistema endócrino, sendo regulado apenas pelo equilíbrio entre a absorção no rúmen, oriundo da dieta, e a sua excreção por via renal, como é possível observar pela figura 3 (Martens & Schweigel, 2000; Martín-Tereso & Martens, 2014).

Uma vez que a absorção e a excreção de Mg raramente estão em equilíbrio, o rim desempenha um papel fundamental na regulação da normomagnesiemia, aumentando ou diminuindo a excreção de Mg em função da quantidade que é absorvida. Contudo, por vezes, a excreção pode ser superior à absorção, mesmo se reduzindo a excreção urinária ao mínimo (<1.0 mM), devido às perdas no leite. Neste caso, a hipomagnesiemia é inevitável, uma vez que não existem mecanismos de regulação, dificultando assim a mobilização de Mg, como por exemplo, do osso (Martín-Tereso & Martens, 2014).

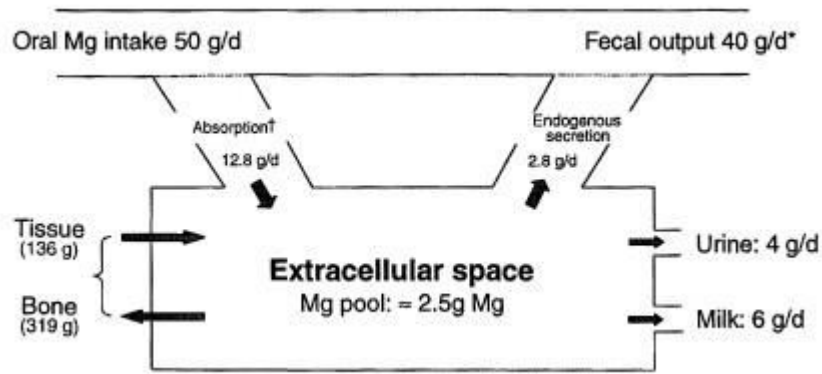


Figura 4- Metabolismo do Mg numa vaca de 700Kg de peso vivo com produção leiteira diária de 40Kg, e digestibilidade aparente de 20% (Martens & Schweigel, 2000).

No rúmen, o Mg pode ser absorvido por duas vias: a paracelular e a transcelular (Martens & Schweigel, 2000).

A via paracelular consiste na passagem do Mg do rúmen para o sangue, através de um gradiente electroquímico, entre o rúmen e o plasma, que leva a passagem do Mg pelas *tight junctions* para o espaço intercelular e posteriormente até à corrente sanguínea (Martens & Schweigel, 2000).

A via transcelular possui maior importância no transporte do Mg, mas é mais complexa, uma vez que se trata de uma via de transporte ativo. Podemos dividir esta via em duas etapas: a primeira consiste na passagem do Mg do rúmen para o espaço intracelular, que é efetuada por um processo de transporte passivo, resultado mais uma vez de um gradiente electroquímico, visto que na maioria das vezes a concentração de Mg no espaço intracelular (0,5 a 1.2 mM), é menor que no fluido ruminal (2 a 4 mM). Porém, o epitélio ruminal possui uma grande diferença de potencial negativo intracelular, de modo que neste caso, o gradiente eléctrico assume maior relevância do que o gradiente químico. A segunda etapa consiste na passagem do Mg do espaço intracelular para a corrente sanguínea. Aqui, a diferença de potencial intracelular passa a ser uma barreira ao nosso objetivo. Assim, para que ocorra passagem de Mg através da membrana basolateral, tem de haver uma troca com o Na que entra para o espaço intracelular, e que posteriormente, voltará a sair da célula, recorrendo a uma bomba de Na/K-ATPase (Martens & Schweigel, 2000).

É importante salientar, que um aumento significativo da ingestão de potássio (K), reduz a absorção de Mg, uma vez que aumenta a diferença de potencial do epitélio

ruminal, e por outro lado reduz a concentração de Na no rúmen. Quanto menor for a concentração de Mg no rúmen, mais influência possui o K na sua absorção. Já uma deficiência em sódio (Na), frequente em animais que pastoreiam em pastagens jovens, devido à carência nestas deste mineral, além de ser um obstáculo direto à absorção de Mg, provoca um aumento na produção de aldosterona, que por sua vez aumenta o teor de K na saliva e conseqüentemente no fluido ruminal. Foi também verificado que elevadas concentrações ruminais do íon amônio (NH_4^+), diminuem a absorção ruminal de magnésio. O modo como isso acontece ainda permanece desconhecido (Martens & Schweigel, 2000).

Assim uma hipomagnesiemia terá as seguintes causas (Corbellini, 1998):

- Concentração insuficiente (< 0,15% da matéria seca) de Mg na dieta;
- Insuficiência de energia na dieta;
- Elevadas concentrações de K ou azoto não proteico (NNP) ou baixas concentrações de Na;
- Situações de stress (condições meteorológicas adversas, movimentação de animais no último terço de gestação).

Devido à hipomagnesiemia, há uma diminuição na concentração de Mg no líquido cefalorraquidiano, provocando contrações musculares não controladas por parte do SNC, e daí o principal sinal clínico da hipomagnesiemia ser a tetania. A hipomagnesiemia pode ser resolvida pela administração retal de sais de Mg, cuja aplicação restaura os níveis deste mineral no sangue em cerca de 5 minutos, e no líquido cefalorraquidiano em cerca de 30 minutos (Martín-Tereso & Martens, 2014).

Como referido no ponto anterior, o Mg tem um papel fundamental na ativação dos recetores da PTH, bem como na sua produção (Goff, 2006). Assim, a hipomagnesiemia é um fator muito importante a ter em conta na avaliação de um animal com hipocalcemia.

2.2 Fósforo

O fósforo (P) é um mineral com diversas funções no organismo, desempenhando funções estruturais a nível molecular, celular e tecidual, e contribui para a estabilidade e rigidez dos ossos e dentes. É um importante interveniente no equilíbrio ácido-base, e é o maior contribuinte para o potencial transmembranar, assim como para o equilíbrio osmótico entre os espaços intra e extracelular. No organismo, a energia é transportada e

armazenada sob a forma PO_4 , como por exemplo o ATP. Nos ruminantes, o fósforo é um componente importante da saliva, uma vez que irá tamponar o pH ruminal (Grünberg, 2014).

Nos vertebrados 80% a 85% do P está armazenado nos osso sob a forma de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2$) e dihidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$), e os restantes 15% a 20% estão distribuídos pelos fluídos e tecidos moles, apenas esta segunda fração constitui o “pool” de P, e destes 15% a 20% menos de 1% está no espaço extracelular (Grünberg, 2014).

Nos bovinos, o P é obtido através da dieta pela forma de ácido fítico, que ao ser digerido pela microflora ruminal liberta o fósforo, o qual será posteriormente absorvido no intestino delgado, com intervenção da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Almeida, 2015). O intervalo de referência para a concentração sérica de P nos bovinos é de 4,0 -8,0 mg/dl (Grünberg, 2014).

Tanto o P como o Ca são controlados pelas mesmas hormonas, onde predomina a PTH, contudo exerce ações opostas. Um aumento de PTH promove um aumento dos níveis séricos de Ca, mas por outro lado, promove a excreção de P, como se pode verificar pelo gráfico 2, pela saliva e pela urina. Assim, um animal com hipocalcemia, ao promover um aumento na produção de PTH para atingir a normocalcemia, pode em função disso, originar uma hipofosfatemia (Tsiamadis *et al*, 2016).

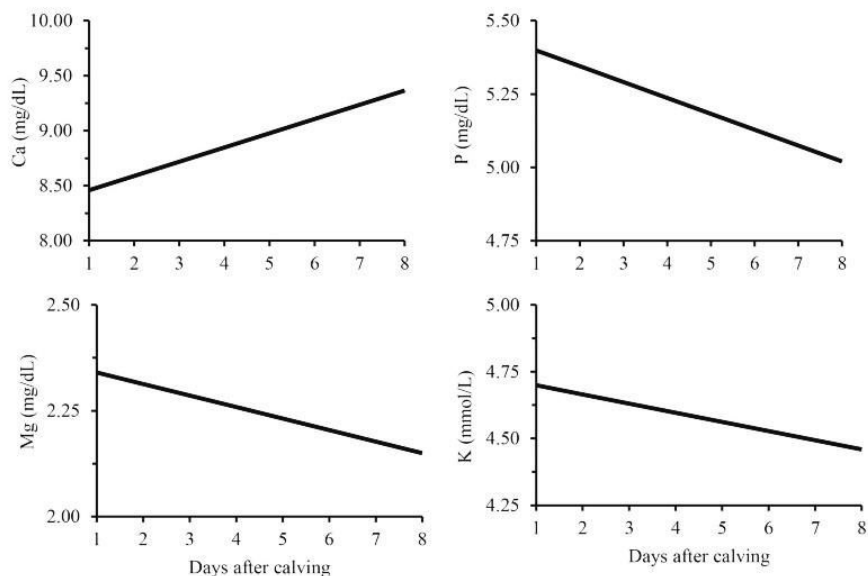


Gráfico 2- Curvas fixas das concentrações séricas de Ca, Mg, P e K incluindo animais de todas as lactações nos 8 dias pós-parto por um modelo de análise de regressão aleatória (Tsiamadis *et al*, 2016).

O fósforo é excretado através da urina e das fezes, sendo esta última a via de excreção mais importante, uma vez que a reabsorção renal de P nos ruminantes é bastante eficiente. Todavia, em situações onde a excreção salivar de P está diminuída, como em casos onde a dieta contém pouca fibra ou é de reduzidas dimensões, a excreção por via urinária aumenta (Lovendahl & Sehested, 2016), bem como quando estimulada pela calcitonina, que no rim tem efeito semelhante ao da PTH, promovendo a excreção de fósforo, ao diminuir a sua reabsorção tubular (Newton & Nunamaker, 1985).

Do P excretado pela saliva, cerca de 80% é reabsorvido no trato gastrointestinal, e os restantes 20% são excretados pelas fezes. A produção diária do animal, também é um importante fator a ter em conta no que diz respeito às perdas de P, uma vez que, por cada litro de leite produzido são mobilizados cerca de 0,7-1,3 g deste mineral. A gestação, principalmente o último trimestre, exige cerca de 1,9 g/d até aos 190 dias e cerca de 5,4 g/d até aos 280 dias (Grünberg, 2014).

O P é um inibidor direto da enzima renal que converte a 25- hidroxivitamina D em 1,25 dihidroxivitamina D, e assim, sempre que a concentração sérica de fósforo estiver superior a 1,9 mmol/L, há uma inibição da 1,25(OH)₂D, dificultando a absorção intestinal de Ca e por consequência a sua homeostasia (Goff, 2004).

2.3 Potássio

O potássio (K) tem como principais funções no organismo, a manutenção do equilíbrio ácido-base, o equilíbrio osmótico, o metabolismo de carboidratos e é co-fator enzimático de enzimas relacionadas com a síntese proteica (Goff, 2006 referido por Almeida, 2015).

A maioria do K presente no organismo encontra-se no fluído intracelular, onde a sua concentração ronda 150-160 mmol/L, enquanto que no fluído extracelular, está entre os 3,9-5,8 mmol/L, pelo que a avaliação da calémia, é um indicador muito pouco fiável do verdadeiro estado do animal. O rácio entre a concentração intra e extracelular, é fundamental para a manutenção do potencial de membrana, afetando também a excitabilidade das células nervosas e musculares (Goff, 2006 referido por Almeida, 2015).

O K é adquirido através da dieta por absorção no trato gastrointestinal, onde chega ao espaço extracelular. O aumento dos níveis extracelulares de potássio estimula a libertação de insulina, que irá promover a ação da bomba Na/K, sobretudo no fígado e tecido

muscular, de modo a que haja passagem de K para o espaço intracelular, permitindo a normocalémia. Durante o exercício físico, há uma estimulação dos recetores β_2 das catecolaminas, promovendo também a ação da bomba Na/K. Por outro lado, quando o animal entra num estado de hipercalémia, há um estímulo para a produção de aldosterona provocando um aumento da excreção renal de K por permuta com o Na, bem como a excreção pela saliva e secreções pancreáticas (Goff, 2006 referido por Almeida, 2015).

Quando o animal se encontra em acidose metabólica, há uma permuta entre o K, que sai para o meio extracelular e o H^+ que entra para o meio intracelular, de forma a reduzir a acidose, sendo assim normal encontrar um animal em hipercalémia quando este se encontra num estado acidótico. O oposto verifica-se quando o animal entra em alcalose metabólica.

O K é um mineral cuja concentração plasmática tem influência na homeostase do Ca, sabe-se que uma dieta rica em K aumenta consideravelmente o risco de incidência de hipocalcemia no peri-parto (DeGaris & Lean, 2008).

Uma elevada ingestão de K pode conduzir à hipocalcemia por duas vias distintas. Um aumento de potássio no plasma, conduz a uma alcalose metabólica, mesmo que ligeira, e a uma diminuição da síntese renal de $1,25(OH)_2D$, que por sua vez diminui a absorção de Ca no intestino delgado. Por outro lado, o incremento deste mineral, diminui a absorção ruminal de Mg, levando a uma hipomagnesiémia, que como referido no ponto anterior, levará a uma diminuição da sensibilidade dos recetores da PTH o que promoverá a hipocalcemia (Bhanugopan *et al*, 2010).

Estudos realizados por Goff & Horst (1997) sugerem que um elevado conteúdo em K na dieta do pré-parto tem um maior contributo para a hipocalcemia no parto do que o próprio conteúdo em Ca dessas dietas, pelo que no período pré-parto não é aconselhado fornecer aos animais alimentos ricos em K como a luzerna.

2.4 Alterações ácido-base

A alcalose metabólica predispõe o animal para a hipocalcemia tanto clínica como subclínica, uma vez que a hipomagnesiémia originada pela alcalose metabólica colabora na falha de reconhecimento da PTH por parte dos seus recetores, alterando a sua estrutura terciária como demonstra a figura 2. Por outro lado, a alcalose diminui a síntese renal de $1,25(OH)_2D$, o que diminui a absorção intestinal de Ca (Bhanugopan *et al*, 2010). A reabsorção óssea, também é diminuída devido à alteração provocada nos recetores da PTH

(Goff, 2014). Em caso de pH elevado, o Ca^{2+} também apresenta uma maior tendência para formação de complexos insolúveis com oxalato, sulfato, fosfato e fluoreto (Morales & Dehority, 2009)

A alcalose pode ser originada, como foi anteriormente referido, por ingestão excessiva de cátions na dieta no período pré-parto, como por exemplo, o K quando são fornecidas grandes quantidades de luzerna aos animais neste período ou, por um aumento da frequência respiratória, como em casos de stress térmico.

O osso é que desencadeia o principal mecanismo tampão em caso de acidose metabólica. Este sofre uma desmineralização, libertando cátions de Ca, de modo a restaurar o pH (Goff, 2000). Assim, um meio ácido promove um aumento da concentração sérica de Ca ionizado (Goff, 2014). Contudo, o aumento dos níveis séricos de Ca aumenta a excreção renal deste mineral de 0.5g a 6g por dia, uma vez que a elevada concentração de hidrogénios (H^+) no filtrado glomerular dificulta a reabsorção de Ca. Se a vaca, no dia do parto, conseguir aumentar a reabsorção de Ca, poderá assim controlar a hipocalcemia. No entanto, ainda não há dados científicos que permitam afirmar se este mecanismo realmente ocorre (Goff, 2014).

Com o objetivo de promover a acidificação metabólica, com vista a controlar a hipocalcemia puerperal, podem ser fornecidas dietas aniónicas aos animais que se encontrem no período pré-parto, pelo menos 10 dias antes do parto (Oetzel, 1996b referido por Thilsing-Hansen *et al.*, 2002).

2.5 Idade dos animais

Baseado no conhecimento empírico médico-veterinário sabe-se que quanto mais velha for a vaca, maior probabilidade esta possui de desenvolver HP. Com o avançar da idade os osteoblastos tornam-se menos ativos, pelo que existe uma resposta mais lenta à PTH e, conseqüentemente, a reabsorção óssea é mais demorada, dificultando a reposição da normocalcemia, além de que o número de recetores da PTH no osso e no rim bem como a quantidade de recetores intestinais da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ também diminuem (Goff, 2000). Assim, é normal e espectável que os casos de HP surjam em multíparas, principalmente a partir da terceira lactação (Goff, 2014).

2.6 Estrogéneos

Apesar de não ser um dos principais fatores, está descrito que a concentração plasmática de estrogénios pode promover a HP.

Segundo Goff (2000), os estrogéneos são potentes inibidores da reabsorção óssea, dificultando assim a reposição dos níveis de Ca no pós-parto.

Em condições fisiológicas normais, o teor de estrogéneos no plasma aumenta consideravelmente poucos dias antes do parto (Goff, 2000), contudo, podem estar elevados devido à dieta a que o animal é submetido, contendo por exemplo, alto teor em trevo e/ou luzernas.

2.7 Raça

A raça dos animais em questão também é um fator a ter em consideração, uma vez que algumas apresentam maior predisposição para hipocalcemia, como por exemplo, a raça *Jersey*. Estes animais produzem leite com maior concentração em Ca, quando comparadas com os bovinos da raça *Holstein* (Goff, 2014). Esta predisposição acontece muito provavelmente devido ao fato dos bovinos da raça *Jersey* possuírem menos 15% de recetores intestinais para a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Horst et al, 1997).

Outras raças, como as Vermelhas-Suecas e as Vermelhas-Norueguesas, também estão referenciadas como mais predispostas à incidência de hipocalcemia (Goff, 2014)

2.8 Condição corporal

Vacas com condição corporal superior a 4, numa escala de 0 a 5, possuem 3,3 vezes maior risco de incidência de hipocalcemia (Heuer *et al.*, 1999 referido por Thilsing-Hansen *et al.*, 2002) provavelmente devido à diminuição de ingestão de alimento no período pré-parto, por falta de apetite (Rukkwamsuk *et al.*, 1999 referido por Thilsing-Hansen *et al.*, 2002).

3. Hipocalcemia como predisposição para outras doenças

Segundo Goff (2008), hipocalcemia é considerada uma “*gateway disease*”, pois leva ao aparecimento de outras afeções (Goff, 2008), visto que, entre outras funções, compromete sobretudo a contractura da musculatura lisa e estriada (Almeida, 2015).

3.1 Distócia

Considera-se como parto distócico, aquele que necessita de intervenção humana para que haja a expulsão do feto por necessidade de tração (Noakes *et al.*, 2001), ou aquele em que o vitelo não possui a apresentação, postura e/ou posição correta, o que corresponde entre 13% a 22% dos casos. As consequências que podem advir de um parto destes são: maior morbidade e maior probabilidade de mortalidade, principalmente do vitelo mas também da progenitora, bem como maior comprometimento nos índices de fertilidade futuros (Funnell & Hilton, 2016).

Os principais fatores de risco para a distócia são: a desproporção feto-maternal e a paridade, pois estudos realizados por Waldner *et al.* (2015) referem que as primíparas possuem maior incidência de distócia, cerca de 17,3%, quando comparadas com as múltíparas, 2,9% - 4,7% (Waldner *et al.*, 2015 referido por Funnell & Hilton, 2016).

Estudos realizados por Proudfoot *et al.* (2009), concluíram que vacas com partos distócicos ingerem menos alimento e água, sobretudo nas 24 horas antes do parto, quando comparadas com vacas com partos eutócicos, muito provavelmente devido à dor acrescida

por o vitelo não se encontrar na apresentação ou posição correta. A redução da ingestão de alimento terá influência na concentração sérica de cálcio, contribuindo para a HP (Sheehy *et al.*, 2017).

Em caso de hipocalcemia há uma diminuição da capacidade contráctil da musculatura lisa e uterina, originando atonia e inércia uterina (Almeida, 2015), ou seja, a hipocalcemia predispõe para um parto distócico por inércia uterina, bem como a distócia poderá potenciar a hipocalcemia por uma diminuição da ingestão de matéria seca.

3.2 Prolapso uterino

O prolapso uterino nos bovinos ocorre sobretudo no pós-parto, nas primeiras 12 a 24 horas. A hipocalcemia reduz a tonicidade do miométrio (Miesner & Anderson, 2008), bem como retarda a involução da cérvix, o que é considerado como um importante fator para o aumento da incidência desta lesão (Richardson *et al.*, 1981). É importante referir que a extração manual do vitelo, ou a tentativa forçada de extração das membranas fetais, constituem fatores predisponentes para a ocorrência desta patologia (Miesner & Anderson, 2008)

Segundo estudos realizados por Risco *et al.* (1984), num grupo de 53 vacas que sofreram um prolapso uterino, às quais foram colhidas amostras de sangue para medição de Ca, 44 (83%) apresentaram hipocalcemia. Destas, 10 (19%) apresentaram hipocalcemia severa (< 4 mg/dl Ca), 15 (28%) apresentaram hipocalcemia moderada ($< 4,1-6,0$ mg/dl Ca) e 19 (36%) dos animais apresentaram hipocalcemia suave ($< 6,1-7,9$ mg/dl Ca). Destes 53 animais avaliados, 9 eram primíparas contudo não foram detetadas variações de Ca significativas, o que lhes levou a concluir que a hipocalcemia está associada à incidência de prolapso uterino sobretudo em múltíparas.

3.3 Deslocamento de abomaso

O impacto económico provocado pelo deslocamento de abomaso (DA) nas explorações é considerável, devido aos custos associados ao tratamento, ao aumento da taxa de refugo e à diminuição da produção de leite (LeBlanc, *et al.*, 2005 referido por Oliveira, 2011).

O deslocamento de abomaso é uma patologia frequente, sobretudo nas explorações leiteiras. Em condições normais, o abomaso possui líquido e localiza-se ventralmente no abdómen (Van Winden *et al.*, 2002), com o piloro estendido para o lado direito caudalmente ao omaso (Goff & Horst, 1997a). O abomaso pode deslocar à esquerda ou à direita, possuindo esta última um pior prognóstico pela maior probabilidade de ocorrer uma torção, contudo, cerca de 90 % dos casos são à esquerda (Shaver, 1997).

A hipocalcemia aumenta o risco de deslocamento de abomaso, muito provavelmente devido à diminuição da motilidade ruminal e abomasal, que a carência deste mineral provoca (Shaver, 1997), o que foi confirmado por estudos realizados por Daniel (1983). Devido a essa falha na contratibilidade abomasal, há acumulação de gás, levando à distensão do abomaso (Goff & Horst, 1997a).

3.4 Retenção de membranas fetais

A retenção de membranas fetais é uma ocorrência bastante frequente na clínica de espécies pecuárias. Apesar de não ser um caso de urgência, não pode ser negligenciado, visto que pode comprometer o função reprodutiva do animal no futuro, pelo fato de os animais que tenham sido alvo desta patologia, possuírem 6 vezes mais probabilidade de desenvolver uma metrite (Smith & Risco, 2005).

Antes que haja a expulsão propriamente dita é necessário que ocorram várias etapas, como dissolução do colagénio do tecido conjuntivo e presença de células polimorfonucleares (neutrófilos) nos placentomas, redução do aporte sanguíneo e contração da musculatura uterina (Smith & Risco, 2005). São nestes últimos dois pontos, que a hipocalcemia pode ser um problema. O Ca, como já foi referido inúmeras vezes, é fundamental para a contração do músculo liso e estriado esquelético, assim, a contração da musculatura uterina irá ser bastante dificultada, ou até mesmo impedida, caso os níveis de Ca do animal se encontrem abaixo do desejado.

Por outro lado, a quantidade de neutrófilos em circulação diminui à medida que o animal se aproxima do parto, recuperando apenas 2 a 3 semanas pós-parto (Kehrli *et al.*, 1989a,b referido por Kimura *et al.*, 2006). Segundo Kimura & Goff (2002) vacas que foram sujeitas a remoção cirúrgica da glândula mamária, não desenvolveram hipocalcemia e por sinal manifestaram um grau menor de imunossupressão (Goff and Kimura, 2002; Nonnecke *et al.*, 2003 referidos por Kimura *et al.*, 2006).

3.5 Mastite

A mastite é a causa mais frequente de antibioterapia nas explorações dos EUA, em 2007 estima-se que só neste país cerca de 9 milhões de vacas foram tratadas para a mastite (Pol and Ruegg, 2007), lesão que diminui a longevidade do animal e aumenta a taxa de refugo na exploração (Polat *et al.*, 2010).

As mastites clínicas, especialmente originadas por coliformes, têm maior incidência no primeiro mês de lactação, provavelmente resultado de uma infeção ainda no período seco ou no início da lactação (Goff & Horst, 1997a).

A atividade do sistema imunitário está diminuída desde uma semana antes até uma semana depois do parto. Na primeira semana de lactação, a eficácia da atividade dos neutrófilos está diminuída, bem como a capacidade de produção de anticorpos pelos linfócitos, por outro lado 7 a 10 dias antes do parto, o teto perde a queratina que sela o seu canal, o que facilita a infeção (Goff & Horst, 1997a).

A hipocalcemia pode promover também a incidência de mastites, uma vez que prejudica a contração do músculo liso, ou seja, há uma perda de tónus do esfíncter do teto, facilitando a entrada de microorganismos (Goff & Horst, 1997a), além de que o Ca é fundamental na ativação das células imunitárias (Kimura *et al.*, 2006). Assim, uma vaca com hipocalcemia possui um risco 8 vezes superior de desenvolver uma mastite (Curtis *et al.*, 1983 referido por Castro, Ribeiro, & Simões, 2009).

3.6 Metrite e endometrite

Durante o parto a contaminação bacteriana do útero é inevitável e, por vezes, os mecanismos de defesa do animal não conseguem neutralizar esses agentes invasores (Smith & Risco, 2005) como *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes* e *Fusobacterium necrophorum* (Bicalho *et al.*, 2012). A metrite é definida como a inflamação de todas as camadas da parede uterina e aumento do tamanho do útero. Endometrite caracteriza-se por ser uma inflamação que está limitada ao endométrio, e o útero apresenta um tamanho próximo do normal (Sheldon *et al.*, 2006).

Como referido anteriormente, o Ca intracelular é fundamental para a ativação das células imunitárias, bem como para o desempenho correto da sua função, uma vez que

contribui para a regulação da proliferação celular, produção de citocinas, e também para a expressão dos recetores dessas citocinas (Kimura *et al.*, 2006)

Em 2012, Martínez *et al.*, verificaram que vacas com hipocalcemia subclínica têm uma menor quantidade de neutrófilos em circulação, além disso a sua eficiência está comprometida, o que predispõe estes animais para a ocorrência de processos infecciosos, como por exemplo uma metrite quando comparados com animais normocalcémicos (Martínez *et al.*, 2012). Um estudo conduzido pelo mesmo autor em 2014, verificou que animais que foram sujeitos a hipocalcemia subclínica induzida, tinham neutrófilos com citosol com menor teor de Ca ionizado, o que afeta a fagocitose (Martinez *et al.*, 2014 referido por Martinez *et al.*, 2016), e por isso, é também um importante fator a ter em conta nas retenções de membranas fetais.

Outros estudos verificaram que a administração subcutânea de Ca após o parto diminuiu a incidência de metrite e endometrite puerperal (Amanlou *et al.*, 2016), e que por cada 1 mg/dl de Ca a mais na corrente sanguínea, o risco relativo de desenvolvimento de metrite reduz cerca de 22% (Martínez *et al.*, 2012)

Deste modo, percebe-se que quando o animal está em hipocalcemia, a atividade imunitária está comprometida, devido à importância deste mineral no desenrolar da resposta imune. Contudo, existem outros fatores que neste período, aliados à hipocalcemia, potenciam a ocorrência de metrite ou endometrite, como as elevadas necessidades nutricionais ou o stress a que o animal está sujeito (Sordillo and Aitken, 2009).

3.7 Cetose

No início da lactação, a quantidade de energia diária que a vaca necessita é inferior à quantidade que consegue obter diariamente através da dieta (Goff & Horst, 1997a), o animal é obrigado a mobilizar reservas corporais, resultando num aumento da concentração sérica e urinária de corpos cetónicos como o β -hidroxibutirato, acetona e acetoacetato, resultantes da β -oxidação de ácidos gordos não-esterificados (Herdt, 2000 referido por Rutherford *et al.*, 2016), uma vez que esses ácidos gordos, originados pela mobilização de reservas corporais, quando na presença de concentrações baixas de glucose não são totalmente oxidados no fígado, provocando um excesso de acetyl-coa que não é metabolizado no ciclo de krebs (Peek & Divers, 2008; Radostitis, Gay, Constable & Hinchcliff, 2007a, referidos por Oliveira, 2011a)

A cetose é definida como uma elevada concentração sérica de corpos cetónicos.

Podemos classificar a cetose como primária ou secundária e clínica ou subclínica. A cetose primária deve-se ao balanço energético negativo que naturalmente ocorre no início da lactação, e por esse motivo há necessidade de recorrer às reservas corporais, já à cetose secundária, deve-se também a mobilização dessas reservas corporais mas por ocorrência de outra patologia, que por sua vez diminui a capacidade de ingestão do animal (Smith 2009 referido por Marques, 2013).

Na cetose clínica, além do aumento da quantidade de corpos cetônicos, o animal apresenta sinais clínicos como inapetência, perda excessiva e rápida de condição corporal e fezes secas. Na cetose subclínica, apesar dos níveis de corpos cetônicos estarem acima do desejável, não há evidência de sinais clínicos (Gordon *et al.*, 2013).

Atualmente o método mais indicado para determinar a concentração sérica de corpos cetônicos é através da medição de β -hidroxibutirato no plasma. Para os valores entre 1,2 e 2,9 mmol/L considera-se que o animal está em cetose subclínica e acima de 3.0 mmol/L considera-se como uma cetose severa (Rutherford *et al.*, 2016).

Estudos realizados em ovelhas por Schlumbohm & Harmeyer (2003) revelaram que o *turnover* da glicose está diminuído em animais com cetose, e que essa diminuição é agravada se os animais estiverem em hipocalcemia, independentemente do estado reprodutivo, ou seja, a hipocalcemia diminui a produção endógena de glicose.

Quando a quantidade de glicose disponível no organismo não é suficiente para suprimir as necessidades, há um estímulo para mobilização de reservas do organismo, o que tem como consequência um aumento de corpos cetônicos no sangue e na urina (Schlumbohm & Harmeyer, 2003).

A influência da hipocalcemia, por si só, na produção de glicose não parece ser relevante, contudo, é mais um fator que destabiliza a homeostase da glicose (Schlumbohm & Harmeyer, 2003), aumentando o risco de uma possível cetose.

Como terapêutica, o mais frequente é a administração de dextrose por via intravenosa e/ou administração por via oral de um precursor da glicose, como o propilenoglicol.

Segundo vários autores, o melhor método é a profilaxia através da administração de um dispositivo intra-ruminal de libertação lenta de monensina-sódica. Este composto é um ionóforo produzido por linhagens de *Streptomyces cinnamonensis*, possuindo assim propriedades antimicrobianas, inibindo as bactérias gram (+) produtoras de acetato, butirato e formato. Por outro lado, as bactérias gram (-) produtoras de succinato, precursor do propionato são resistentes a este composto (Bergen & Bates, 1984), contribuindo para

um menor balanço energético negativo, o que reduz a probabilidade da incidência de cetose.

De um modo geral, podemos resumir a hipocalcemia e as consequências resultantes no animal pela figura 5.

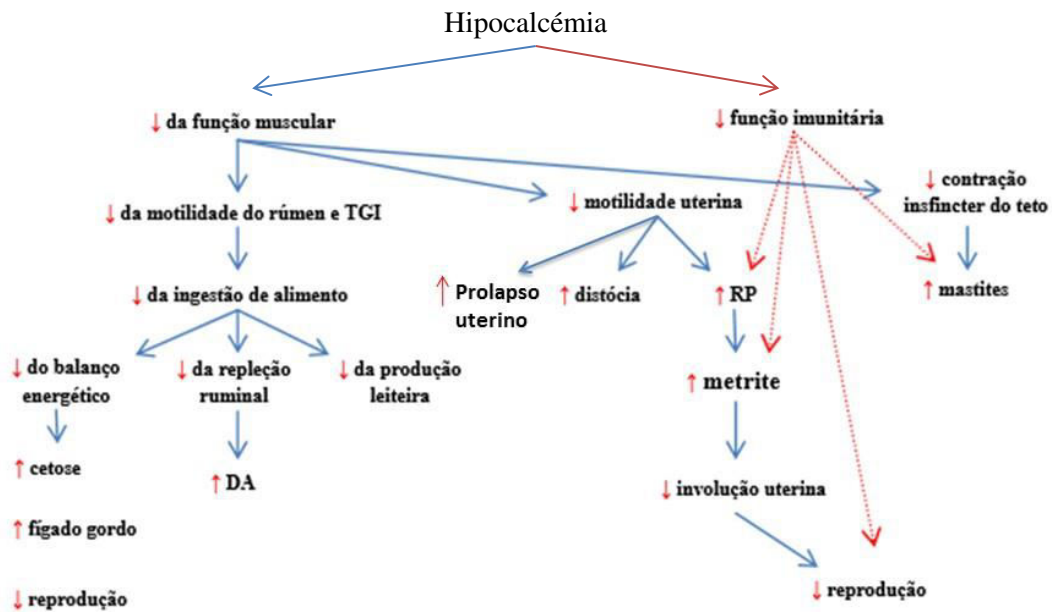


Figura 5 - Consequências da hipocalcemia. ↓ - Diminuição da incidência, ↑- Aumento da incidência, RP- Retenção placentária, DA – Deslocamento do abomaso, TGI – Trato gastrointestinal. (Esquema adaptado de Mulligan *et al.*, 2006 referido por Almeida 2015).

4. Sinais clínicos

4.1 Hipocalcemia subclínica

O reconhecimento da hipocalcemia subclínica continua a ser um dos grandes desafios nas explorações, pois a concentração sérica de Ca está diminuída (< 8.0 mg/dl), mas não há manifestação de sinais clínicos. A hipocalcemia subclínica representa um prejuízo muito superior que a hipocalcemia clínica, uma vez que os efeitos adversos da hipocalcemia estão presentes contudo existe dificuldade de diagnóstico pela inexistência de sinais clínicos (Oetzel, 2013).

4.2 Hipocalcemia clínica

A hipocalcemia clínica, ao contrário da subclínica, deve ser das afeções que os veterinários e os produtores mais facilmente identificam devido à sua elevada incidência.

Nestes casos, os sinais clínicos podem ocorrer desde as 24 horas antes do parto até 72 horas pós-parto (Divers & Peek, 2008 referido por Oliveira, 2011).

Pode-se fazer uma classificação em três graus, consoante os sinais clínicos apresentados (Oetzel, 2013):

- I. Evidência de sinais clínicos como: tetania, hiperexcitabilidade, fraqueza e ataxia dos membros posteriores, contudo o animal não está em decúbito;
- II. O animal apresenta-se em decúbito esternal, paralisia parcial, depressão moderada a severa e cabeça por vezes debruçada sobre o flanco;
- III. O animal encontra-se em decúbito lateral, depressão severa, totalmente paralisado. Ausência de reflexo pupilar e anal, atonia ruminal, pelo que os animais podem apresentar timpanismo, ausência de micção e defecação e hipotermia (Radostitis *et al.*, 2007 referido por Almeida 2015). São casos de urgência, pois se não forem tratados morrem em poucas horas.

5. Diagnóstico

Para diagnóstico de hipocalcemia é necessário recolher uma amostra de sangue do animal, e enviar para laboratório para medição de Ca total ou de Ca ionizado, onde os valores de referência são apresentados pela tabela 1. Dado o custo das análises, as medições de Ca total são as mais frequentes na prática clínica, embora necessitem de uma interpretação mais atenta, uma vez que um animal com hipoalbuminémia apresentará uma diminuição do Ca total, contudo, a fração biologicamente ativa, a ionizada, pode permanecer inalterada (Goff, 2014).

Tabela 1- Valores séricos de referência da concentração de Ca total segundo Goff (2014).

| Classificação | Ca Total | |
|--------------------------------|---------------|-----------------|
| Normocalcémia | 8,0-10 mg/dl | 2,1-2,5 mmol/L |
| Hipocalcémia subclínica | 5,5-8,0 mg/dl | 1,38-2,0 mmol/L |
| Hipocalcémia severa | 0-5,4 mg/dl | 0-1,37 mmol/L |

6. Opções terapêuticas

O tratamento da hipocalcemia deve ser realizado o quanto antes, especialmente se o animal de encontrar em decúbito, uma vez que a pressão exercida pelo peso do animal, causa compressão dos nervos periféricos e músculos podendo progredir para necrose (Goff, 2008).

6.1 Administração intravenosa de cálcio

O método mais rápido para repor a normocalcémia é a administração intravenosa de sais de Ca, como por exemplo o borogluconato de cálcio, utilizando uma dose de referência de 2g Ca/ 100Kg. A taxa de administração deve ser de cerca de 1g/min, pois uma administração demasiado rápida pode provocar uma arritmia fatal (Goff, 2008).

Segundo Goff (2008), este método mantém os níveis séricos de Ca acima do limite mínimo por cerca de 4 horas, como se pode observar pelo gráfico 3. Já Le Blanc *et al.* (2014) verificaram que ao administrar 500 ml de gluconato de Ca a 23% pode prolongar este período até às 10 horas após tratamento. Contudo, também constataram que 24 horas após a administração intravenosa de sais de Ca, os níveis séricos de cálcio eram inferiores ao grupo de controlo, que não recebeu qualquer tratamento, o que leva a crer que a administração intravenosa de Ca é necessária, mas por si só insuficiente para repor a normocalcémia. Este método pode ser associado com administração oral de cálcio.

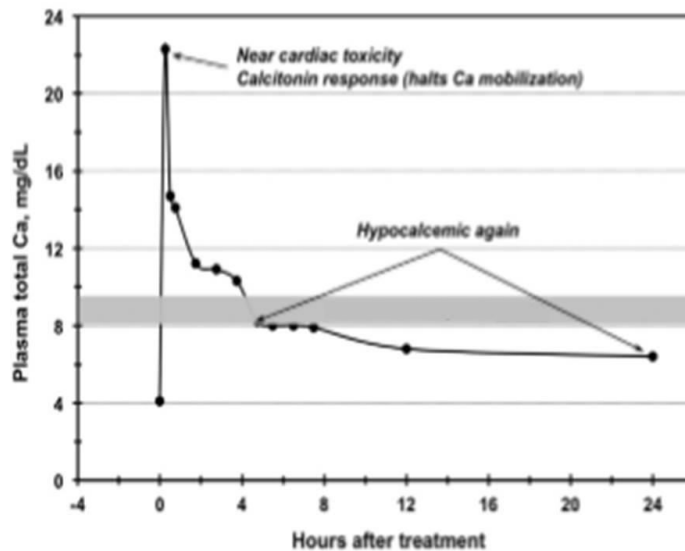


Gráfico 3- Efeito da administração intravenosa com 10.8g de Ca, na concentração plasmática de cálcio em bovinos da raça Jersey com hipocalcemia clínica (Adaptado de Goff, 1999 referido por Oetzel, 2013)

6.2 Administração subcutânea de cálcio

A administração de Ca por via subcutânea é possível, contudo, a absorção pode variar, uma vez que o fluxo sanguíneo periférico está muitas vezes comprometido. Por cada local de administração, a quantidade de Ca administrada não deve exceder 1.5 g, o que equivale a cerca de 50-70 ml na maioria das preparações comerciais (Goff, 2008).

6.3 Administração intramuscular de cálcio

A via intramuscular também é mencionada pela literatura como possível para o tratamento da hipocalcemia, utilizando por exemplo lactato de Ca ou levulinato de Ca, no entanto, devido ao risco de necrose, a quantidade de cálcio por local de administração é reduzida, entre 0.5-1.0g, exigindo cerca de 6 a 10 locais distintos de administração o que pode ter um impacto negativo na qualidade da carne (Goff, 2008).

7. Prevenção

7.1 Dietas aniónicas

Ender *et al.* (1971), verificaram que a adição de ácidos inorgânicos à alimentação das vacas no pré-parto reduzia a incidência de hipocalcemia clínica. Assim, concluíram que a incidência desta patologia está relacionada com a quantidade de catiões (Na^+ e K^+), em relação à de aniões (Cl^- e SO_4^{2-}) (Ender et al, 1971 referido por Horst *et al.*, 1997).

A maioria dos catiões presentes na alimentação dos bovinos são Na^+ , K^+ , Ca^{+2} e Mg^{+2} , e aniões são Cl^- , SO_4^{-2} , PO_4^{-3} . Os catiões e aniões presentes na dieta, ao serem absorvidos, alteram o equilíbrio ácido-base da corrente sanguínea e consequentemente o ph do sangue (Goff, 2008).

À exceção do K e do Cl, todos os outros minerais podem ser incorporados na dieta a taxas fixas (**Na** 1,2 g/Kg; **Ca** 8,5-10 g/Kg; **Mg** 3,5- 4 g/Kg; **P** 4 g/Kg; **S** < 4 g/Kg), contudo, é necessário ter em atenção a quantidade de P na dieta, pois uma incorporação superior a 80 g/dia bloqueia a produção renal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Goff, 2008). Para cálculo da diferença de catiões e aniões na dieta (DCAD), a fórmula mais utilizada é $\text{DCAD (meq)} = (\text{Na} + \text{K}) - (\text{Cl} + \text{S})$ (Thilising-Hansen *et al.*, 2002) sendo a DCAD recomendada cerca de -100meq (Horst *et al.*, 1997).

Um DCAD negativo reduz a incidência de hipocalcemia clínica abaixo dos 20%, mas no caso desta diferença ser positiva, a incidência desta patologia pode variar entre os 0 e os 80% (Thilising-Hansen *et al.*, 2002). A dieta aniónica reduz o ph sanguíneo, aumentando a resposta dos recetores da PTH (Goff, 2014).

A dieta aniónica deve iniciar-se pelo menos 10 dias antes do parto (Oetzel, 1996 referido por Thilising-Hansen *et al.*, 2002), contudo este método apresenta uma grande desvantagem, que é a palatabilidade da dieta o que reduz a ingestão de matéria seca (Oetzel & Barmore, 1993 referido por Franco, 2016).

Como controlo, um ph urinário entre 5,5 e 6,2 é indicador de uma administração bem-sucedida de sais aniónicos (Thilising-Hansen *et al.*, 2002).

7.2 Dietas reduzidas em cálcio

Outro método de prevenção possível, recorrendo à alimentação dos animais, é uma dieta com teor de Ca reduzido.

Um bovino de leite no período seco possui uma baixa necessidade em Ca, cerca de 14 g/dia no caso dos bovinos da raça *Jersey*, até 22 g/dia nos bovinos da raça *Holstein* (Goff, 2008), de modo que a alimentação é suficiente para suprimir as suas necessidades inativando os mecanismos de homeostasia de Ca (Horst *et al.*, 1994 referido por Franco, 2016).

Ao ingerir uma dieta pobre em Ca, a vaca não obtém o suficiente para suprimir as suas necessidades, isto provoca uma diminuição nos níveis séricos de cálcio, estimulando a libertação de PTH, que por sua vez estimula a reabsorção óssea e a produção renal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, responsável pela absorção intestinal de Ca. Deste modo, no momento do parto, os mecanismos de homeostasia de Ca, nomeadamente os osteoclastos, já se encontram ativos, bem como os enterócitos. Mesmo em caso de alcalose metabólica, há uma redução, mas apenas parcial, da sensibilidade dos recetores da PTH (Goff, 2008).

Este método é mais fácil de aplicar em explorações onde os bovinos se encontram em pastoreio, uma vez que as gramíneas possuem menos de 4 g/Kg de Ca, o que perfaz um total de 28 g/dia de Ca ingerido, admitindo que a ingestão diária de matéria seca ronda os 6-7 Kg. Em explorações intensivas, o produtor pode recorrer a sequestrantes de Ca que se ligam a este mineral promovendo a sua excreção pelas fezes, diminuindo assim a sua absorção. Esta dieta deve ser retirada logo após o parto (Goff, 2008).

7.3 Vitamina D e os seus metabolitos

A administração de vitamina D ou dos seus análogos, pode ser útil na prevenção da hipocalcemia, uma vez que aumenta a absorção intestinal de Ca (Goff, 2008), contudo o seu uso é controverso, uma vez que a sua eficácia é bastante variável e a dose exigida está bastante próxima da dose tóxica, originando sinais clínicos como anorexia, perda de peso, taquicardia, dispneia e calcificação dos tecidos moles. (Thilsing-Hansen *et al.*, 2002).

A dose recomendada está entre as 20-30.000 UI/dia, durante os 14 dias que antecedem o parto. Estudos anteriores sugeriam a administração diária de doses superiores a 10 milhões de unidades de vitamina D, porém, verificou-se que doses entre 500 mil a 1

milhão de unidades induziam hipocalcemia clínica, devido ao feedback negativo exercido pelas elevadas concentrações de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e 25-OH vit. D na secreção de PTH, e síntese renal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Goff, 2008).

A administração de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e análogos pode ser mais efetivo e seguro que a utilização de vitamina D, neste caso, o feedback negativo exercido no rim pode ser minimizado, retirando a administração deste fármaco, lentamente durante os primeiros dias pós-parto (Goff, 2008).

7.4 Administração de cálcio oral

A administração de soluções de Ca por via oral é algo bastante comum, no entanto a sua eficácia está dependente da capacidade de absorção do trato gastrointestinal. Essa absorção acontece com recurso a dois mecanismos já aqui mencionados, o ativo que depende de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, e o paracelular que depende do gradiente de concentração (Goff & Horst, 1993). Ambos os mecanismos foram descritos no ponto 1.3 na página 5.

Este método recorre sobretudo à via paracelular, uma vez que aumenta a concentração de Ca no lúmen intestinal acima de 1 mM, valor que representa, em média, a concentração extracelular de Ca. A absorção paracelular pode também ocorrer no rúmen, se a concentração intra-ruminal de Ca for superior a 1,5 mM (Holer *et al* referido por Goff & Horst, 1993).

Estudos realizados por Goff & Horst (1993), onde utilizaram cloreto de Ca, propionato de Ca e carbonato de Ca, verificaram que o CaCl_2 foi o sal com melhor desempenho a elevar a concentração plasmática de cálcio e que a facilidade de absorção dos mesmos está relacionada com a sua facilidade de solubilidade na água. Neste caso, a absorção de Ca no rúmen considera-se limitada, uma vez que a solução irá ser rapidamente diluída diminuindo a concentração intra-ruminal abaixo de 1,5 Mm, apesar de se suspeitar que o elevado poder osmótico da solução estimule o reflexo da goteira esofágica, e que parte da solução administrada possa chegar diretamente ao abomaso, evitando a diluição no rúmen. Todavia, por cada 24h não devem ser administradas mais de 288g de CaCl_2 devido ao risco de originar uma acidose metabólica. Já o propionato de Ca, apesar da razoável eficácia no aumento da calcémia, exige cerca de 800ml de água para diluir 50g deste sal o que torna a sua utilização pouco prática (Goff, 1993). O CaCl_2 , por outro lado, também é bastante cáustico podendo originar úlceras na mucosa bucal e na mucosa digestiva (Horst *et al.*, 1997)

Avaliando as alterações nos níveis séricos de Ca, a administração oral de 100 g de Ca equivale à administração de 8 a 10g de Ca por via intravenosa, em particular, a administração oral de 50g de Ca na forma de cloreto de cálcio em 250ml de água, equivale a administrar por via intravenosa 4g do mesmo sal (Goff, 1993).

Segundo Goff (2008) a administração oral de Ca, por si só, não deve ser encarada como tratamento mas sim como método preventivo. São diversas as formulações disponíveis no mercado, quer em forma de bolo, gel, pasta ou líquido. As formas líquidas têm a desvantagem de poderem ser aspiradas, provocando pneumonias por falso trajeto (T. Thilsing-Hansen *et al.*, 2002), enquanto os bolos orais evitam esse risco (Pehrson & Jonsson, 1991).

II. Trabalho experimental

1. Introdução

Ao longo dos anos, numa tentativa de acompanhar as exigências do mercado e tornar as explorações mais rentáveis, os produtores foram obrigados a trabalhar e a selecionar animais com maior produtividade. Ora, essa exigência produtiva torna esses animais mais suscetíveis à incidência de determinadas doenças, como a hipocalcemia puerperal (HP).

A maioria dos bovinos com aptidão leiteira, passam por algum grau de hipocalcemia. De acordo com estudos realizados nos EUA a incidência de hipocalcemia subclínica em vacas leiteiras multíparas ronda os 50% (Goff, 2014), começando a ser um problema a partir da segunda lactação (Oetzel, 2015). A grande questão está na capacidade dos mecanismos de homeostasia do Ca contrariarem este estado, sendo que, quando isto não acontece, prosseguem para um estado mais grave de hipocalcemia, que se torna num sério problema para o animal e para o produtor (França, 2013). Cada caso clínico de vaca caída nos EUA custa cerca de 334 US\$ (Rebhund referido por Corbellini, 1998).

Na exploração onde decorreu o presente estudo, sentiu-se a necessidade que todos os protocolos, incluindo os profiláticos, fossem de certo modo standardizados, de forma a que tenham mais fácil execução e que se insiram de forma harmoniosa com a rotina. A prevenção da hipocalcemia não é exceção, e há alguns anos que o médico veterinário responsável procura uma solução nesse sentido.

Um estudo anterior realizado por Franco (2016) permitiu descontinuar a administração sistemática de soluções de cálcio, por via endovenosa, a todas as vacas multíparas. Neste caso, estudou-se a utilização de bolos intra-ruminais, utilizando o produto com o nome comercial bovikalc®, onde as diferentes posologias surgem da ideia de verificar qual o melhor método com a melhor relação mão de obra/preço/eficiência.

O bovikalc® é constituído por cloreto de cálcio, que é uma fonte Ca de rápida absorção e por sulfato de cálcio que possui maior relevo como substância de suporte do que nutritiva. Devido ao fato do cloreto de cálcio ser agressivo para as mucosas, este bolo é revestido por uma película de gordura (Gilles, 2013).

A posologia sugerida pelo fabricante, inicialmente consistia na administração de 4 bolos, onde o 1º deveria ser administrado aos primeiros sinais de parto, o 2º imediatamente após o parto, o 3º 12-15h após o parto e o 4º 24-30h após o parto. Recentemente, o

protocolo recomendado pelo fabricante foi reduzido a apenas 2 bolos, 1º imediatamente após o parto e o 2º 12h após o parto.

Assim, este estudo surge na sequência do de Franco (2016), em busca de uma estratégia preventiva, económica, prática e uniforme da HP.

2. Objetivos

- ✓ Verificar o efeito dos protocolos em estudo na prevenção de hipocalcemia clínica e subclínica;

3. Materiais e métodos

3.1 Amostra

Para a amostra do presente estudo, foram seleccionadas todas as vacas com pelo menos uma lactação, que pariram entre 20 de setembro de 2016 e 31 de janeiro de 2017, o que se traduziu num total de 104 animais. Para que cada grupo ficasse equilibrado todos os animais foram divididos tendo em conta o número de lactações e raça, como demonstra a tabela 2, grupo Z (n=27), grupo B1 (n=25), grupo B11 (n=26) e grupo B2 (n= 26). É importante referir que os animais procross são indivíduos fruto desse programa, uma vez que procross não é uma raça, mas sim o nome de um programa de *crossbreeding* que utiliza as vacas *Holstein* existentes, e reprodutores *Montbeliard* e Vermelhas Suecas. Na amostra deste estudo 32% dos animais são Procross e 68% são *Holstein*, como se pode verificar pelo gráfico 4.

Os animais que entraram em hipocalcemia antes do parto, ou até às 24h pós-parto, foram excluídos do estudo.

Os bolos utilizados apresentam como nome comercial *bovikalc®*. Cada bolo pesa cerca de 192 g contendo 43g de Ca na forma de cloreto de cálcio (71%) e de sulfato de cálcio (29%) (Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.).

Tabela 2 - Distribuição dos animais que compõem a amostra pelos diferentes grupos respectivo nº de lactações e raça.

| Grupo | Nº de animais por grupo consoante o nº de lactações | | | | | | Holstein | Procross | Total animais |
|------------|---|---|---|---|---|---|----------|----------|---------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | | |
| Z | 10 | 8 | 5 | 3 | 1 | 0 | 18 | 9 | 27 |
| B1 | 9 | 6 | 5 | 3 | 1 | 1 | 19 | 6 | 25 |
| B11 | 10 | 7 | 5 | 3 | 1 | 0 | 17 | 9 | 26 |
| B2 | 9 | 8 | 4 | 4 | 1 | 0 | 17 | 9 | 26 |

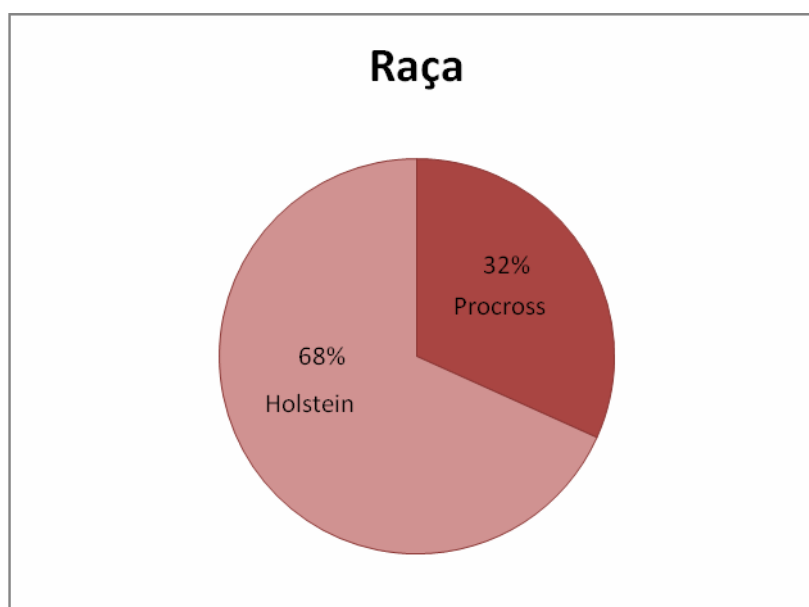


Gráfico 4- Distribuição dos animais constituintes da amostra em função da raça.

3.2 Desenho experimental

A cada vaca pertencente ao estudo, como se pode constatar pelas figuras 6 e 7, foi aplicada uma marca auricular, onde a cor dessa marca indica a que grupo do estudo pertence o respetivo animal:

- Grupo Z – Marca branca;
- Grupo B1 – Marca azul;
- Grupo B11 – Marca verde;
- Grupo B2 – Marca amarela.



Figura 6 – Marcas auriculares e respectivo alicate de aplicação.



Figura 7 – Animal do grupo B1 com marca auricular azul.

Os animais de cada grupo foram sujeitos aos seguintes procedimentos:

- Grupo Z – Não foi realizado qualquer procedimento;
- Grupo B1 – Administração de um bolo intra-ruminal logo após o parto ou assim que se verificasse que o animal tivesse parido;
- Grupo B11 - Administração de um bolo intra-ruminal logo após o parto ou assim que se verificasse que o animal tivesse parido, e outro bolo no dia seguinte de manhã após a ordenha;
- Grupo B2 - Administração de dois bolos intra-ruminais logo após o parto ou assim que se verificasse que o animal tivesse parido.

Foram recolhidas amostras de sangue a todos os animais no momento do parto, ou assim que se verificou que o parto tivesse ocorrido, e nos dois dias seguintes de manhã após a ordenha. Para mais fácil interpretação designámos a primeira amostra por 0h, a segunda amostra por 24h e a terceira amostra por 48h. Porém, cada uma destas amostras não foi colhida rigorosamente passadas essas horas do parto mas da seguinte forma: A primeira amostra (0h) foi colhida após o parto, quando este foi assistido, ou após a ordenha da manhã após o parto; a segunda amostra (24h) foi colhida após a ordenha da manhã do dia seguinte após o parto; a terceira amostra (48h) foi colhida após a ordenha da manhã do segundo dia após o parto. Os intervalos entre as colheitas das amostras e as administrações de bovicalc® foram constantes em todos os grupos nos três momentos.

Estas amostras foram colhidas para um tubo de ensaio e seguidamente centrifugadas durante 15 minutos a 2000 rotações por minuto. O plasma foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5 ml como se pode observar pela figura 9 e armazenado num congelador a -20 C°, seguindo posteriormente para laboratório recorrendo a uma embalagem de transporte térmica igual á representada na figura 10 para medição de Ca

total pelo método “ABX Pentra Calcium AS CP” cujo protocolo é apresentado no anexo III.



Figura 8 – Centrífuga utilizada no processamento das colheitas de sangue.

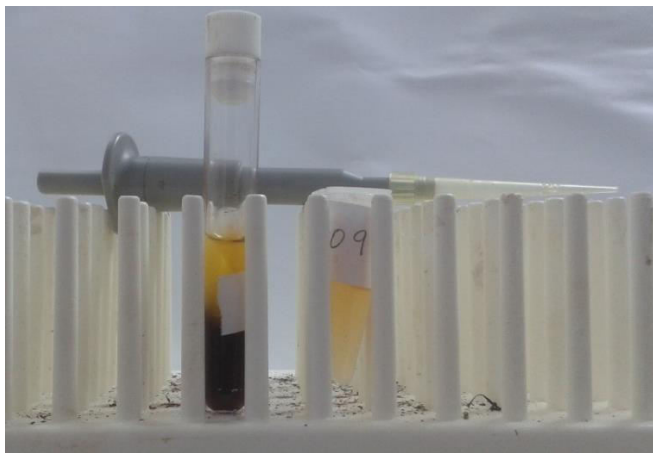


Figura 9 – Tubo com amostra de sangue após ter sido centrifugado, já com o plasma separado no tubo eppendorf, identificado e pronto para seguir para laboratório.



Figura 10 – Embalagem térmica de transporte das amostras para o laboratório.

4. Resultados

Os resultados apresentados foram testados através de a realização de um teste anova mista cujos pressupostos são apresentados no anexo I.

A normalidade da distribuição foi testada pelo teste de shapiro-wilk, resultando num $p\ value \geq \alpha = 0,05$ ou seja, todos os grupos nos três momentos de medição apresentam uma distribuição normal.

Quanto à homogeneidade da variância entre grupos nos vários momentos de colheita de amostras, testada pelo teste de levene, verificou-se um $p\ value \geq \alpha = 0,05$ pelo que existe homogeneidade de variância entre os grupos em cada um dos 3 momentos de recolha de cálcio.

Já em relação à esfericidade, testada pelo teste de mauchly's w., verificou-se um $p\ value \leq \alpha = 0,05$ assumindo-se a não existência de esfericidade, tendo de se utilizar as correções epsilon. No entanto, como a média entre as correções epsilon de greenhouse-geisser e huynh-feldt é maior que 0,75 ($0,834 + 0,884/2=0,859$), pode assumir-se a esfericidade.

No que diz respeito à normalidade dos resíduos, é assumida a normalidade das distribuições, uma vez que os resíduos apresentaram assimetrias ($sk/ep < |3|$) e achatamentos ($ku/ep < |3|$).

Quanto aos resultados, na tabela 3, são apresentados os descritivos das médias de Ca por grupo em cada momento da recolha.

Tabela 3 - Descritivos das médias de cálcio por grupo em cada momento de recolha, bem como o desvio padrão de cada situação

| Cálcio (mg/dl) | Grupo | N | Média | Desvio-padrão |
|-----------------------|--------------|-----------|--------------|----------------------|
| 0 horas | Z | 19 | 6,862 | 0,242 |
| | B2 | 21 | 6,470 | 0,230 |
| | B11 | 19 | 6,503 | 0,242 |
| | B1 | 21 | 6,628 | 0,230 |
| | Total | 80 | 6,612 | 1,046 |
| 24 horas | Z | 19 | 6,775 | 0,230 |
| | B2 | 21 | 7,070 | 0,219 |
| | B11 | 19 | 7,033 | 0,230 |
| | B1 | 21 | 7,213 | 0,219 |
| | Total | 80 | 7,029 | 0,997 |
| 48 horas | Z | 19 | 7,616 | 0,208 |
| | B2 | 21 | 7,530 | 0,198 |
| | B11 | 19 | 7,721 | 0,208 |
| | B1 | 21 | 7,505 | 0,198 |
| | Total | 80 | 7,589 | 0,895 |

Observa-se que na recolha às **0 horas**, o grupo que apresentou uma média de cálcio mais elevada é o Z (M=6,862; DP=0,242), seguido do B1 (M=6,628; DP=0,230), do B11 (M=6,503; DP=0,242), sendo o B2 o grupo que apresentou uma média de cálcio mais baixa (M=6,470; DP=0,230).

Na recolha às **24 horas**, o grupo que apresentou uma média de cálcio mais elevada já é o B1 (M=7,213; DP=0,219), seguido do B2 (M=7,070; DP=0,219), do B11 (M=7,033; DP=0,230), sendo o grupo Z o que apresentou uma média de cálcio mais baixa (M=6,775; DP=0,230).

Por último, na recolha às **48 horas**, o grupo que apresentou uma média de cálcio mais elevada é o B11 (M=7,721; DP=0,208), seguido do Z (M=7,616; DP=0,208), do B2 (M=7,530; DP=0,198), sendo o grupo B1 o que apresentou uma média de cálcio mais baixa (M=7,505; DP=0,198).

Os valores atrás referidos podem ser observados no gráfico 5.

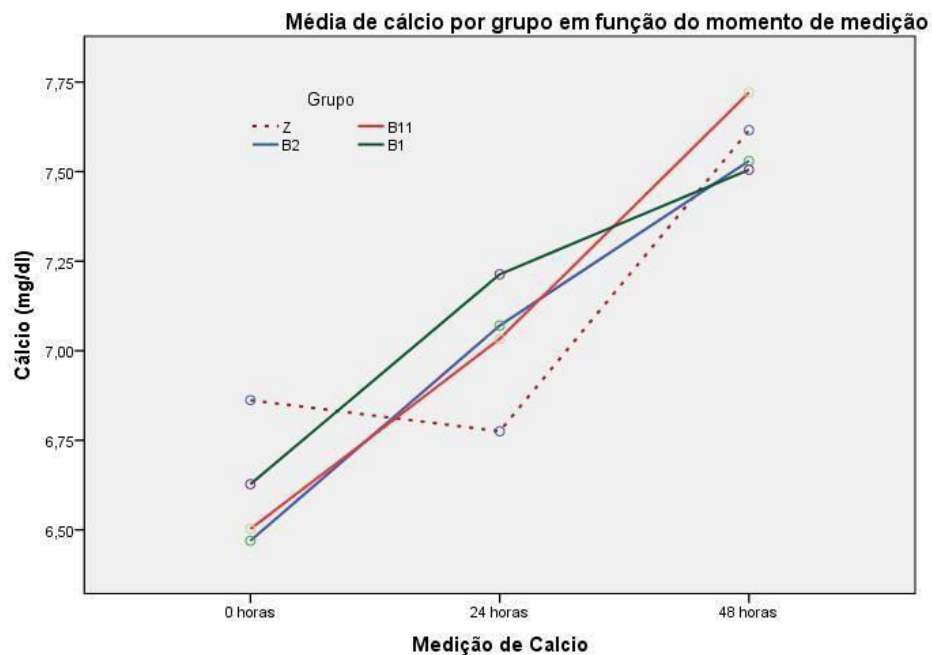


Gráfico 5 – Valores médios de cálcio em cada momento de recolha.

Em relação à testagem da diferença entre os grupos, verifica-se pela tabela 4 que **não existem diferenças significativas entre os 4 grupos** nos três momentos de recolha de amostras (anova, $F(3,76)=0,047$; $p=0,986$). Na mesma tabela, são também apresentados os resultados da testagem de comparação dos valores médios de cálcio nos 3 momentos de recolha, assim como a existência de um efeito de interação, ou seja, em que medida a pertença a um grupo poderá afetar o nível de cálcio no momento da recolha. Contudo, ainda pela tabela 4, verifica-se que existem diferenças significativas (anova; $F(2,152)=40,861$; $p=0,000$) entre as medições de Ca intragrupo.

Tabela 4 - Testagem de diferenças entre grupos e intragrupo em cada momento de medição de cálcio. type III sum of squares – somatório dos quadrados, df – graus de liberdade, f – estatística de teste e sig.- significância ou valor p

| | Fonte | Type III Sum of Squares | df | Quadrado médio | F | Sig. |
|---|-----------------|-------------------------------|-----|-------------------|----------|------|
| Entre grupos | Interceção | 11990,711 | 1 | 11990,711 | 5982,625 | ,000 |
| | Grupo | ,282 | 3 | ,094 | ,047 | ,986 |
| | Erro | 152,323 | 76 | 2,004 | | |
| Intra grupo (Esfericidade assumida) | MMCálci | 38,479 | 2 | 19,240 | 40,861 | ,000 |
| | MMCálci o | 4,104 | 6 | ,684 | 1,453 | ,198 |
| | * Grupo | | | | | |
| | Erro (Calcio | 71,570 | 152 | ,471 | | |

Tabela 5 – Diferenças de médias de cálcio entre os momentos de medição.

| Grupo | Momento de medição de cálcio | | Diferença de médias | P |
|-------------------|---------------------------------|----------|------------------------|-------|
| Z (n=19) | 0 horas | 24 horas | -,087 | 1,000 |
| | 24 horas | 48 horas | ,841 | ,000 |
| | 0 horas | 48 horas | ,754 | ,019 |
| B2 (n=21) | 0 horas | 24 horas | ,601 | ,006 |
| | 24 horas | 48 horas | ,460 | ,047 |
| | 0 horas | 48 horas | 1,060 | ,000 |
| B11 (n=19) | 0 horas | 24 horas | ,531 | ,026 |
| | 24 horas | 48 horas | ,688 | ,002 |
| | 0 horas | 48 horas | 1,218 | ,000 |
| B1 (n=21) | 0 horas | 24 horas | ,586 | ,008 |
| | 24 horas | 48 horas | ,292 | ,361 |
| | 0 horas | 48 horas | ,878 | ,003 |

Na tabela 5 estão especificadas as diferenças intragrupo, onde no grupo Z, observa-se uma diminuição de 0,087 mg/dl do valor médio de cálcio entre a medição às 0 h e às 24h, não sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=1,000 >0,05$). Este é o único grupo em que a presente situação ocorre, uma vez que nos grupos B2, B11 e B1 observaram-se aumentos nos valores de cálcio entre as medições às 0h e 24h, todos estatisticamente significativos ($p<0,05$).

Observou-se, ainda, um aumento nos valores médios de cálcio entre as 24h e as 48h em todos os grupos, no entanto somente os aumentos observados nos grupos Z, B2 e B11 são estatisticamente significativos ($p<0,05$). O aumento de 0,292 mg/dl observado no grupo B1 não é estatisticamente significativo ($p>0,05$).

Em todos os grupos observou-se uma diferença significativa entre os valores médios de cálcio às 0 horas e às 48 horas ($p<0,05$). A maior diferença observada ocorre no grupo B11, com uma diferença de 1,218 mg/dl e a menor no grupo Z, sendo de 0,754 mg/dl.

Relativamente à existência de um efeito de interação entre o grupo e o momento de medição de cálcio, observa-se um padrão diferenciado do grupo Z. Este grupo foi o que apresentou maior valor médio de cálcio às 0 horas, diminuindo no entanto às 24h, passando a ser o grupo com o valor médio mais baixo na medição às 24h. Foi o único grupo que apresenta uma diminuição do valor médio de cálcio das 0 para as 24h, à semelhança dos restantes grupos, das 24h para as 48h o grupo Z apresentou um aumento do valor médio de cálcio, nomeadamente para valores similares aos dos restantes grupos.

Apesar deste padrão diferenciado dos grupos B ao longo dos 3 momentos de medição, com contenção do aumento dos valores de cálcio das 0 horas para as 24h, voltando à tabela 4, este efeito diferenciado do grupo sobre os valores médios de cálcio não é no entanto estatisticamente significativo como se pode apurar pela tabela 4 (anova; $F(6,152)= 1,453$; $p=0,198$).

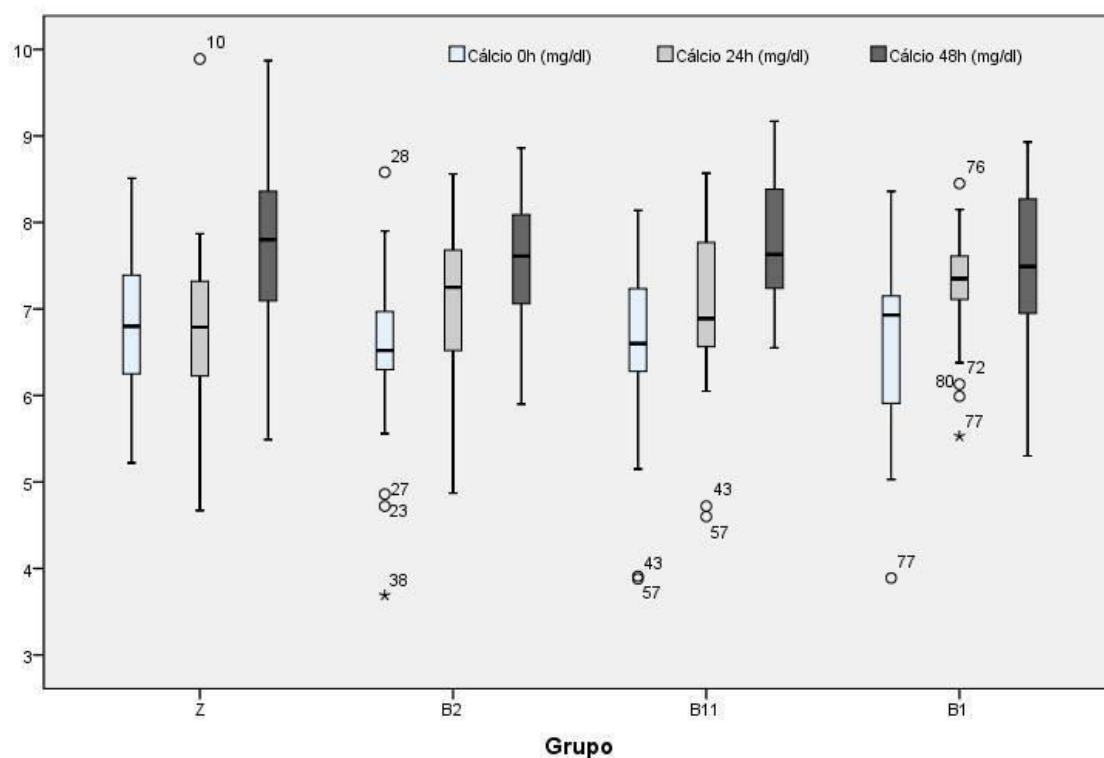


Gráfico 6 - Distribuição dos valores de cálcio de todos os grupos nos três momentos de recolha

No gráfico 6 estão representados todos os valores de Ca de todos os grupos nos diferentes momentos, e podemos observar que às 0h o grupo B2 é aquele que apresenta uma mediana mais baixa, seguido do grupo B11, Z e B1, às 24h o grupo que apresenta a mediana mais baixa é o Z, seguindo-se os grupos B11, B2 e B1, já às 48h o grupo B1 é o que apresenta a mediana menor seguindo-se os grupos B2, B11 e Z.

Ainda pelo gráfico anterior, ao analisar o 2º e 3º quartil é visível que às 24h o grupo B1 é aquele que apresenta 50% dos animais com níveis mais elevados de Ca, seguindo-se os grupos B2, Z e B11. Já às 48h o grupo Z é aquele cujo 50% dos casos têm valores de Ca mais elevados seguindo-se os grupos B11, B2 e B1.

Posteriormente, respeitando a mesma estrutura em termos de grupos, os dados foram divididos por raça e realizou-se a análise estatística para cada uma das raças, testando-se a existência de diferenças significativas de cálcio entre momentos de recolha (0h, 24h e 48h - medidas repetidas), e entre grupos e de efeitos de interação entre grupo e momento de recolha, somente com animais Holstein ou somente com animais procross.

No que diz respeito à raça Holstein, a normalidade da distribuição foi testada através do teste shapiro-wilk, onde se verificou que $p \geq \alpha=0,05$, ou seja, todos os grupos nos 3 momentos de medição apresentam distribuição normal.

Quanto à homogeneidade da variância, pelo teste de levene, também se verificou que $p \geq \alpha=0,05$, pelo que existe homogeneidade de variância entre os grupos em cada um dos 3 momentos de recolha de cálcio.

Testou-se a esfericidade através do teste de mauchly's w., onde se constatou que $p < \alpha=0,05$, ou seja, não existe esfericidade tendo de se utilizar as correções epsilon. No entanto como a média entre as correções epsilon de greenhouse-geisser e huynh-feldt é maior que 0,75 ($0,829 + 0,912/2=0,8705$), pode assumir-se a esfericidade.

No que respeita aos resíduos a normalidade das distribuições é assumida, uma vez que os resíduos apresentaram assimetrias $(sk/ep) < |3|$ e achatamentos $(ku/ep) < |3|$.

Para os animais *procross*, verificaram-se os mesmos pressupostos atrás mencionados para a raça Holstein, com a diferença que na verificação de esfericidade pelo teste de mauchly's w. verificou-se logo que $p > \alpha=0,05$, assumindo-se logo a existência de esfericidade.

Tabela 6 - Médias de cálcio para cada raça, em cada momento de recolha tendo em conta o grupo, bem como o desvio padrão de cada situação

| | <i>Holstein</i> | | | | <i>Procross</i> | | |
|-----------------------|-----------------|-----------|------------------|------------------|-----------------|------------------|----------------|
| | Grupo | N | Média (mg/dl) | Desvio padrão | N | Média (mg/dl) | Desvio padrão |
| Cálcio 0h (mg/dl) | Z | 11 | 6,5464 | ,64139 | 8 | 7,2963 | ,82365 |
| | B2 | 13 | 6,2577 | 1,28670 | 8 | 6,8138 | ,77811 |
| | B11 | 11 | 6,3645 | 1,17214 | 8 | 6,6925 | 1,27912 |
| | B1 | 15 | 6,4487 | 1,18175 | 6 | 7,0750 | ,34180 |
| | <i>Total</i> | <i>50</i> | <i>6,4020</i> | <i>1,08628</i> | <i>30</i> | <i>6,9623</i> | <i>,88574</i> |
| Cálcio 24h (mg/dl) | Z | 11 | 6,4245 | ,93178 | 8 | 7,2575 | 1,30790 |
| | B2 | 13 | 6,9023 | 1,13674 | 8 | 7,3438 | ,76412 |
| | B11 | 11 | 6,9936 | 1,03919 | 8 | 7,0875 | 1,26675 |
| | B1 | 15 | 7,1007 | ,76469 | 6 | 7,4950 | ,49682 |
| | <i>Total</i> | <i>50</i> | <i>6,8768</i> | <i>,97242</i> | <i>30</i> | <i>7,2827</i> | <i>1,00238</i> |
| Cálcio 48h (mg/dl) | Z | 11 | 7,3927 | ,94231 | 8 | 7,9225 | 1,26360 |
| | B2 | 13 | 7,4054 | ,97019 | 8 | 7,7325 | ,50039 |
| | B11 | 11 | 7,8327 | ,80443 | 8 | 7,5675 | ,75172 |
| | B1 | 15 | 7,3787 | ,96430 | 6 | 7,8217 | ,79356 |
| | <i>Total</i> | <i>50</i> | <i>7,4886</i> | <i>,91851</i> | <i>30</i> | <i>7,7570</i> | <i>,84221</i> |

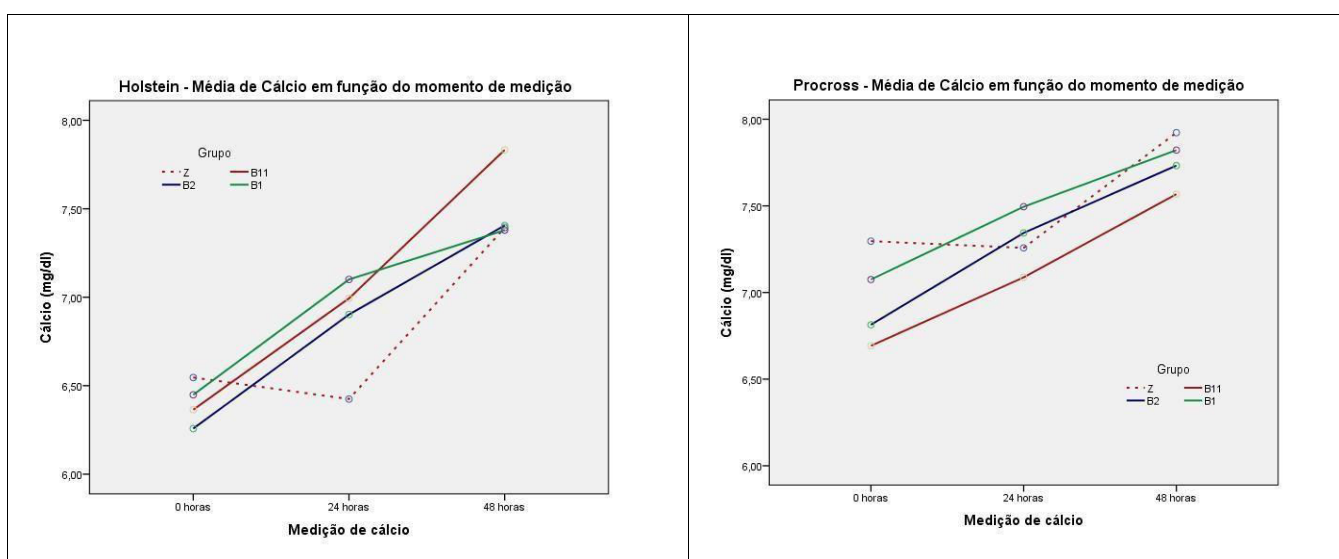
Como se pode observar pela tabela 6, às **0h** para a raça *Holstein*, o grupo Z é o que apresenta uma média de Ca mais elevada (M=6,546;DP=0,641), seguindo-se o grupo B1 (M=6,449;DP=1,181), o grupo B11 (M=6,365;DP=1,172) e com a média mais baixa o grupo B2 (M=6,258;DP=1,287). Em relação aos animais *procross*, o grupo com a média de Ca mais elevada foi o grupo Z (M=7,296;DP=0,824), seguindo-se o grupo B1 (M=7,07;DP=0,342), o grupo B2 (M=6,814;DP=0,778) e por fim o grupo B11 (M=6,69;DP= 1,279).

Na medição às **24h** para a raça *Holstein*, o grupo que apresentou a média de Ca mais elevada foi o B1 (M=7,101;DP=0,764), seguindo-se o grupo B11 (M=6,994;DP=1,039), o grupo B2 (M=6,902;DP=1,137) e com a média mais baixa o

grupo Z (M=6,424;DP=0,931). Para os animais *procross*, a média mais alta foi do grupo B1 (M=7,495;DP=0,497), seguindo-se o grupo B2 (M=7,344;DP=0,764), o grupo Z (M=7,258;DP=1,308) e com o valor mais baixo o grupo B11 (M=7,09;DP=1,267).

Na recolha às **48h** para a raça *Holstein*, o grupo que apresentou a maior média de Ca foi o B11 (M=7,833;DP=0,804), seguindo-se o grupo B2 (M=7,41;DP=0,970), o grupo Z (M=7,393;DP=0,942) e com a média mais baixa o grupo B1 (M=7,379;DP=0,964). Para os animais *procross*, o grupo Z (M=7,923;DP=1,264) foi o que apresentou a média mais elevada, seguindo-se o grupo B1 (M=7,821;DP=0,794), o grupo B2 (M=7,733;DP=0,500) e com a média mais baixa o grupo B11 (M=7,568;DP=0,752).

Estes valores podem ser observados nos gráficos 7 e 8.



Gráficos 7 e 8 - Medição média dos níveis de cálcio por grupo em cada momento de recolha, à esquerda o gráfico 7 representa a raça *Holstein* e à direita o Gráfico 8 representa os animais *procross*.

Tabela 7 - Testagem de diferenças entre grupos e intragrupo em cada momento de medição de cálcio (MMCálcio) para vacas *Holstein* e vacas *procross*. type III sum of squares – somatório dos quadrados, df – graus de liberdade, f – estatística de teste e sig.- significância ou valor p

| | | Type III | | | | | |
|--|---------------|---------------|----------------|------|----------------|---------------|-------------|
| | | Fonte | Sum of Squares | Df | Quadrado Médio | F | Sig. |
| Entre grupos | Holstein | Interceção | 7064,936 | 1 | 7064,936 | 3718,582 | ,000 |
| | | Grupo | 1,561 | 3 | ,520 | ,274 | ,844 |
| | | Erro | 87,395 | 46 | 1,900 | | |
| | Procross | Interceção | 4776,963 | 1 | 4776,963 | 2386,520 | ,000 |
| | | Grupo | 2,079 | 3 | ,693 | ,346 | ,792 |
| | | Erro | 52,043 | 26 | 2,002 | | |
| Intra grupo (<i>esfericida de assumida</i>) | Holstein | MMCálcio | 29,958 | 2 | 14,979 | 26,142 | ,000 |
| | | MMCálcio * | 3,822 | 6 | ,637 | 1,112 | ,362 |
| | | Grupo | | | | | |
| | Procross | Erro (Calcio) | 52,714 | 92 | ,573 | | |
| | | MMCálcio | 9,351 | 2 | 4,675 | 13,859 | ,000 |
| | | MMCálcio * | ,794 | 6 | ,132 | ,392 | ,881 |
| | Grupo | | | | | | |
| | Erro (Calcio) | 17,543 | 52 | ,337 | | | |

Em relação às diferenças entre grupos, pela tabela 7, pode ler-se que não existem diferenças significativas entre os 4 grupos, nos 3 momentos da recolha de cálcio nas vacas *Holstein* (anova, $F(3,46)=0,274$; $p=0,844$) e nas vacas *procross* (anova, $F(3,26)=0,346$; $p=0,792$). Na mesma tabela são também apresentados os resultados da testagem de comparação dos valores médios de cálcio dos animais da raça *Holstein* e dos animais *procross* nos 3 momentos de recolha, assim como a existência de um efeito de interação, ou seja, em que medida a pertença a um grupo afeta o nível de cálcio no momento da recolha.

Relativamente às comparações ao longo dos 3 momentos de recolha, pode observar-se que existem diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de cálcio,

dentro de cada grupo, entre os 3 momentos de medição nas vacas *Holstein* (anova; $F(2,92)= 26,142$; $p=0,000$) e nas vacas *procross* (anova; $F(2,52)= 13,859$; $p=0,000$).

A especificação das diferenças por grupo para cada tipo de vaca é apresentada na tabela 8, onde se verifica que nas vacas *Holstein* os diferentes grupos apresentam diferentes padrões de variação de cálcio entre os 3 momentos de recolha.

Tabela 8 - Comparações múltiplas entre momentos de medição de cálcio, em cada grupo, para animais *Holstein* e *procross*.

| Grupo | Momento de medição de cálcio | | <i>Holstein</i> | | <i>Procross</i> | |
|-------------------|------------------------------|-----------------|-----------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|
| | | | Diferença de médias (mg/dl) | P | Diferença de médias (mg/dl) | P |
| | 0 horas | 24 horas | -,122 | 1,000 | -,039 | 1,000 |
| Z (n=11) | 24 horas | 48 horas | ,968 | ,003 | ,665 | ,077 |
| | 0 horas | 48 horas | ,846 | ,104 | ,626 | ,246 |
| | 0 horas | 24 horas | ,645 | ,066 | ,530 | ,094 |
| B2 (n=13) | 24 horas | 48 horas | ,503 | ,152 | ,389 | ,535 |
| | 0 horas | 48 horas | 1,148 | ,007 | ,919 | ,040 |
| | 0 horas | 24 horas | ,629 | ,116 | ,395 | ,306 |
| B11 (n=11) | 24 horas | 48 horas | ,839 | ,011 | ,480 | ,299 |
| | 0 horas | 48 horas | 1,468 | ,001 | ,875 | ,054 |
| | 0 horas | 24 horas | ,652 | ,040 | ,420 | ,392 |
| B1 (n=15) | 24 horas | 48 horas | ,278 | ,720 | ,327 | ,970 |
| | 0 horas | 48 horas | ,930 | ,023 | ,747 | ,219 |

No grupo Z, observa-se uma diminuição de 0,122 mg/dl do valor médio de Ca entre a medição às 0 horas e as 24h, sendo que esta diminuição não é significativa ($p=1,000 > 0,05$). Entre as 24h e 48h observa-se um aumento de 0,968 mg/dl, sendo este aumento estatisticamente significativo ($p=0,003 < 0,05$). O aumento de 0,846 mg/dl entre as 0h e as 48h não é estatisticamente significativo ($p=0,104 > 0,05$).

No grupo B2, observa-se um aumento de 0,645 mg/dl de cálcio entre as 0h e as 24h, o qual não é significativo ($p=0,066 > 0,05$), o mesmo acontecendo com o aumento de 0,503 mg/dl entre as 24h e as 48h ($p=0,152 > 0,05$). O aumento no intervalo entre as 0h e as 48 (1,148 mg/dl) é considerado estatisticamente significativo ($p=0,007 < 0,05$).

No grupo B11, observa-se um aumento de 0,629 mg/dl de cálcio entre as 0h e as 24h, aumento este que não é estatisticamente significativo ($p=0,116 > 0,05$). Entre 24h e as 48h observa-se um aumento estatisticamente significativo de 0,839 mg/dl ($p=0,011 < 0,05$). O aumento de 1,468 mg/dl no intervalo entre as 0h e as 48h é igualmente estatisticamente significativo ($p=0,001 < 0,05$).

No grupo B1, observa-se um aumento de 0,652 mg/dl de cálcio entre as 0h e as 24h, aumento este que é estatisticamente significativo ($p=0,040 < 0,05$). Entre 24h e as 48h o aumento é de 0,278 mg/dl não sendo estatisticamente significativo ($p=0,720 > 0,05$). O aumento de 0,930 mg/dl no intervalo entre as 0h e as 48 é estatisticamente significativo ($p=0,023 < 0,05$).

Tal como nas vacas *Holstein*, o grupo Z de vacas *procross* apresenta uma diminuição dos valores médios de cálcio entre a medição às 0h e às 24h, a qual não é, no entanto, estatisticamente significativa ($p=1,000 > 0,05$). Nos restantes grupos observa-se um aumento dos valores de cálcio entre a medição às 0h e 24h, sendo que nenhum é estatisticamente significativo ($p>0,05$).

Por fim, apesar de em todos os grupos das vacas *procross* observar-se um aumento dos valores de cálcio entre a medição às 24h e 48h, nenhum desses aumentos é estatisticamente significativo. O mesmo acontece com a diferença entre os valores às 0h e às 48h, onde somente o grupo B2 apresenta um aumento de valor de cálcio estatisticamente significativo ($p=0,040 < 0,505$).

Relativamente à existência de um efeito de interação entre o grupo e o momento de medição de cálcio, apesar dos padrões diferenciados entre os grupos ao longo dos 3 momentos medição de cálcio, nas vacas *Holstein* e nas vacas *procross*, as diferenças observadas não são estatisticamente significativas, pelo que se conclui não existir efeito de interação entre o grupo e os valores médios de cálcio nos 3 momentos de recolha, nem para as vacas *Holstein* (anova; $F(6,92)= 1,112$; $p=0,362$), nem para as vacas *procross* (anova; $F(6,52)= 0,392$; $p=0,881$)

5. Discussão

No grupo Z, verificou-se uma descida do Ca total das 0h para a medição das 24h de -0,87 mg/dl ($p=1,000$), foi o único grupo a apresentar uma descida dos níveis de Ca ao longo do tempo, porém, posteriormente das 24h para as 48h teve uma subida de 0,841 mg/dl ($p=0,00$). Apesar da descida de Ca às 24h não ter significância estatística, está de acordo com estudos realizados por Goff (2014) onde descreve que o nadir da concentração sanguínea de Ca ocorre entre as 12 e 24h pós parto (Goff, 2014). Esta descida deve-se provavelmente ao fato do animal, no início do período pós-parto, ser refratário ao estímulo provocado pela PTH (Martig & Mayer, 1973). Por sinal, os animais deste grupo não foram sujeitos a nenhuma administração de Ca.

Apesar de dentro do mesmo grupo, ao longo do tempo, existirem diferenças estatisticamente significativas ($p=0,00$), como mostra a tabela 4, quando analisamos especificamente pela tabela 5 as diferenças entre cada recolha, apenas os grupos B2 e B11 apresentaram diferenças significativas em todos estes períodos. Ou seja, apenas os animais submetidos a estes dois protocolos apresentam uma subida significativa dos níveis séricos de cálcio às 24h e às 48h.

O grupo B1 apresentou uma subida significativa ($p=0,003$) das 0h para as 48h de cerca de 0,878 mg/dl, contudo, apenas a diferença entre as 0h e as 24h (0,586 mg/dl) é significativa ($p =0,008$) o que poderá ser justificado pelo fato de apenas às 0h ter sido administrado um Bovicalc®, no entanto, para o mesmo período, o protocolo realizado para o grupo B2 apresenta uma diferença significativamente ($p=0,006$) superior. No período entre as 24h e as 48h não existe uma diferença significativa ($p=0,361$) o que inferioriza o protocolo para este grupo em relação aos restantes.

Comparando os grupos B11 e B2, podemos observar que o B11 foi o que teve maior diferença entre as 0h e 48h de 1,218mg/dl ($p=0,00$) e entre as 24h e as 48h de 0,688 mg/dl ($p=0,002$), porém, o grupo B2 foi o que teve uma diferença significativamente maior ($p=0,601$) no período entre as 0h e as 24h, 0,601 mg/dl.

Ora, como foi referido anteriormente, pelos estudos de Goff (2014) o período crítico da HP localiza-se entre as 12h e as 24h pós-parto. Tendo em conta apenas esta perspetiva, o protocolo B2 seria vantajoso uma vez que o animal seria manipulado uma só vez, sendo esta a única vantagem, uma vez que o custo da prevenção será o mesmo que o protocolo do grupo B11, e as diferenças de Ca entre grupos, com a dimensão da amostra

em questão, não são significativas ($p=0,986$), como apresenta a tabela 4. Todavia, a baixa significância estatística ($p=0,047$) do grupo B2 no período das 24h às 48 h desfavorece este protocolo em relação ao do B11.

O grupo B11 foi o que às 48h apresentou maior média de Ca, com uma média de 7,721 mg/dl e um desvio padrão de 0,208 mg/dl, e por sinal foi o que provocou maior elevação nos níveis de Ca entre as 0h e as 48h, com uma diferença de 1,218 mg/dl ($p=0,00$). Sampson *et al.* (2009) verificaram um aumento significativo da concentração sérica de Ca ao suplementarem vacas multíparas com 2 bolos orais de cálcio, o primeiro após o parto e o segundo 12h depois (Sampson *et al.*, 2009). Goff (2008) também recomenda duas administrações orais de Ca, uma no momento do parto e a segunda após 24h.

Apesar do aumento significativo ($p=0,000$) ao longo do tempo em todos os grupos, em nenhum deles, em qualquer momento, a média de Ca foi superior a 8,0 mg/dl e portanto, nenhum dos protocolos parece ser eficaz em estabelecer a normocalcemia por si só.

Segundo Melendez *et al.*(2002), não existe um efeito notório da suplementação oral de Ca com CaCl_2 em explorações que utilizem dietas aniônicas, concluindo que esta suplementação pode não se justificar em explorações que utilizem essas dietas durante o período seco, além de que a administração de cloreto de Ca a animais que tenham sido submetidos a esta dieta pode levar a uma perigosa acidose metabólica (Goff & Horst, 1993 referido por Goff, 2008). Na exploração onde decorreu o presente estudo, nos 20 dias antes da data prevista de parto foi adicionado na alimentação dos animais constituintes da amostra um sequestrante de Ca, o que pode diluir o verdadeiro desempenho de cada protocolo, e as diferenças entre os mesmos. A alimentação dos animais no período seco apresenta um DCAD de 161 meq/Kg, já a dos animais em fase de pré-parto apresenta um DCAD de 151 meq/Kg.

Tentando valorizar ao máximo os dados obtidos, e por mera curiosidade, submeteu-se a testagem os mesmos grupos, com os mesmos protocolos, mas separando as raças.

Existem algumas diferenças entre ambas, apesar de **não serem significativas entre os grupos**, tanto **para a raça *Holstein*** ($p=0,844$) **como para os animais *procross*** ($p=0,792$).

Para ambos os tipos de animais volta-se a verificar que o grupo Z é o único onde existe uma descida dos valores de Ca, embora os animais da raça *Holstein* tenham apresentado uma diferença maior, -1,22 mg/dl ($p=1,000$) que os animais *procross* -0,039 mg/dl ($p=1,000$).

Pela tabela 8 verificamos que as diferenças entre momentos de recolha de amostras, para doseamento de Ca total, em todos os grupos e em todos os períodos é maior para a

raça *Holstein* à exceção do período 24h -48h do grupo B1, onde os animais *procross* apresentam uma diferença maior, sugerindo que os animais da raça *Holstein* sejam mais suscetíveis aos protocolos utilizados. Em concordância, podemos observar pelos gráficos 7 e 8 que os animais *procross* em todos os grupos, no momento 0h, apresentam um valor de Ca mais elevado que os animais da raça *Holstein*. Contudo, neste ponto, é necessário ter em conta que o programa *procross* se iniciou em 2012, e portanto, os animais são mais novos e com menos lactações. Segundo Goff (2000), os animais com mais lactações têm maior predisposição para a HP uma vez que o número de recetores da PTH no osso e no rim, bem como a quantidade de recetores intestinais da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, diminuem com a idade, tornando a resposta à PTH mais lenta.

Ao analisar o período das 0h às 48h, verifica-se que na raça *Holstein* o protocolo que provoca uma diferença maior é o B11 com um aumento significativo ($p=0,001$) de 1,468 mg/dl enquanto nos animais *procross* o protocolo B2 parece ter mais sucesso, com um aumento significativo de 0,919 mg/dl, sugerindo que o protocolo a adaptar pode variar consoante a tipologia de animais que a exploração possui.

Esta análise torna-se ambígua devido ao número de animais, uma vez que a amostra é constituída por 68% animais *Holstein* e 32% *procross*, como demonstra o gráfico 4, e pelo fato dos animais *procross* serem animais mais novos. A análise preliminar destes dados permite sugerir que a diferença entre estas raças seja aprofundada em trabalhos futuros.

6. Conclusão

Cada vez mais a eficiência produtiva das explorações tem sido a chave de sucesso das mesmas, permitindo elevar o nível produtivo e melhorando a saúde e bem-estar dos animais, uma vez que o fator económico é determinante.

A rotina diária de uma exploração e a sua sistematização é fundamental para a gestão do seu efetivo, permitindo uma melhor organização de pessoal e evitando esquecimentos.

Nesta dissertação, apesar de não existir uma diferença significativa ($p=0,986$) entre os grupos, verificou-se que o protocolo utilizado no grupo B11 foi aquele que se aproximou mais dos objetivos traçados, estando de acordo com as recomendações atuais do fabricante do *bovikalc*®, por outro lado o protocolo instaurado no grupo B2 também poderá ser uma solução viável. A escolha do protocolo a aplicar em cada exploração

deverá relacionar-se com a facilidade de mão-de-obra e de administrações. No caso desta exploração em particular, considerando os protocolos B11 e B2, optar-se-á pelo protocolo B11, visto que é o que provoca um maior aumento dos níveis séricos de cálcio, tendo em conta que o custo do protocolo por animal é o mesmo e existe disponibilidade de mão-de-obra

Nenhum dos protocolos estudados, por si só, parece ser suficiente para prevenir a hipocalcemia subclínica de uma exploração, sendo a alimentação no período pré-parto um fator bastante importante no auxílio da prevenção da HP. Contudo a implementação rotineira dos bolos intra-ruminais de cálcio parece contribuir para a redução dos casos de risco de hipocalcemia clínica no pós-parto, uma vez que todos os protocolos provocaram um aumento significativo dos níveis séricos de cálcio.

Bibliografia

- Almeida, João Paulo Gonçalves (2015) *Avaliação da calcémia em vacas leiteiras no pós-parto após a administração de Vitamina D₃*, Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, Página 2-3
- Amanlou, H; Akbari A. P.; Farsuni, N. E.; Silva-del-Río, N. (2016) *Effects of subcutaneous calcium administration at calving on mineral status, health, and production of Holstein cows*. Journal of Dairy Science, Volume 99, Página 9199-9210
- Arioli, Edson L. e Corrêa, Pedro Henrique S. (1999) *Hipocalcemia*, Arquivos Brasileiros Endocrinologia e Metabologia, Páginas 467-471
- Bergen, W.G.; Bates, D.B. (1984) *Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action*. Journal of Animal Science, Champaign, Volume 58, Páginas 1465-1483
- Bhanugopan, M. S.; Fulkerson, W. J.; Fraser, D. R.; Hyde, M.; McNeill, D. M. (2010) *Carryover effects of potassium supplementation on calcium homeostasis in dairy cows at parturition*. Journal of Dairy Science, Volume 93, Número 5, Páginas 2119 – 2129
- Bicalho, M. L., V. S. Machado, G. Oikonomou, R. O. Gilbert, and R. C. Bicalho. (2012). *Association between virulence factors of Escherichia coli, Fusobacterium necrophorum, and Arcanobacterium pyogenes and uterine diseases of dairy cows*. Veterinary Microbiology Volume 157, Páginas 125–131
- Blanc, C. D.; Van Der List, M; Aly, S. S.; Rossow, H. A; Silva-del-Rio, N (2014) *Blood calcium dynamics after prophylactic treatment of subclinical hypocalcemia*

with oral or intravenous calcium. Journal of Dairy Science, Volume 97, Número 11, Páginas 6901-6906

- Brown, Edward M. (2013) *Role of the Calcium-Sensing receptor in extracellular calcium homeostasis.* Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, Volume 27, Número 3, Páginas 333 – 343
- Castro, D., Ribeiro, C., & Simões, J. (2009). *Medicina da produção: incidência e distribuição de doenças metabólicas em explorações de bovinos de elevada produção leiteira na Região de Aveiro, Portugal.* Londrina, Volume 3, Número 2, Páginas 1-14
- Corbellini, Carlos N. (1998) *Etiopatogenia e controle da hipocalcemia e hipomagnesiemia em vacas leiteiras.* Traduzido por Felix H. D. González. In: González, F.H.D.; Ospina, H.P.; Barcellos, J.O.J (Eds.) *Anais do Seminário Internacional sobre deficiências minerais em Ruminantes.* Editora da UFRGS, Porto Alegre, RS. Brasil, Páginas 1,2.
- Daniel, R.C.W. (1983) *Motility of the rumen and abomasum during hypocalcemia.* Canadian Journal of Comparative Medicine, Volume 47, Página 276
- DeGaris, P. J. e Lean, I. J. (2008). *Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles.* Veterinary Journal, Página 58-69.
- França, Romão da Cruz (2013) *Hipocalcemia subclínica da vaca leiteira,* Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, Página 3.
- Franco, Vasco Rodrigues Jara (2016) *Efeito da suplementação de cálcio oral no pós-parto como método de prevenção de hipocalcemia,* Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Portugal, Páginas 20-40

- Funnel, B. J. e Hilton, W. M. (2016) *Management and Prevention of Dystocia*. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, Volume 32, Páginas 511-522
- Goff, Jesse P. (2000). *Pathophysiology of Calcium and Phosphorus disorders*. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, Volume 16, Páginas 319-334
- Goff, Jesse P. (2004). *Macromineral disorders of the transition cow*. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, Volume 20, Páginas 471- 494
- Goff, Jesse. P. (2006). *Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders*. Animal Feed Science and Technology, Páginas 237–257.
- Goff, J. P. (2008). *The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows*. The Veterinary Journal, Volume 176, Páginas 50–57
- Goff, Jesse P. (2014). *Calcium and Magnesium disorders*. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, Volume 30, Número 2, Páginas 359-381
- Goff, Jesse P. e Horst, R. L. (1997), a, *Physiological Changes at Parturition and Their Relationship to Metabolic Disorders*. Journal of Dairy Science, Volume 80, Páginas 1260-1268
- Gordon, J. L.; LeBlanc, S. J.; Duffield, T. S. (2013) *Ketosis Treatment in Lactating Dairy Cattle*. Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice, Volume 29, Páginas 433-445
- Grünberg, Walter (2014). *Treatment of Phosphorus Balance Disorders*. Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice, Volume 30, Páginas 383-408

- Herdt, T. H. (2000). *Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver*. Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice, Volume 16, Páginas 215–230
- Horst, R. L.; Goff, Jesse P.; Reinhardt, A. e Buxton, D. R. (1997) *Strategies for Preventing Milk Fever in Dairy Cattle*. Journal of Dairy Science, Volume 80, Páginas 1269-1280
- Kimura, K.; Reinhardt, T. A. e Goff, Jesse P. (2006) *Parturition and Hypocalcemia Blunts Calcium Signals in Immune Cells of Dairy Cattle*. Journal of Dairy Science, Volume 89, Páginas 2588-2595
- LeBlanc, S., Leslie, K., & Duffield, T. (2005). *Metabolic Predictors of Displaced Abomasum in Dairy Cattle*. Journal of Dairy Science, Volume 88, Páginas 159-170
- Gilles, Le Jean (2013) *Bolus for treating hypocalcemia in Ruminants*, <https://www.google.com/patents/US20130344005>
- Lovendahl, P. e Sehested, J. (2016) *Short communication: Individual cow variation in urinary excretion of phosphorus*. Journal of Dairy Science, Volume 99, Páginas 4580-4585
- Marques, Filipa Isabel Ribeiro (2013) *Efeito do B.E.N. na recuperação Metabólica, Produtiva e Reprodutiva de Bovinos Leiteiros*, Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Portugal, Páginas 14-15
- Martens, Holger e Schweigel, Monika (2000). *Pathophysiology of Grass Tetany and other Hypomagnesemias*. Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice, Volume 16, Páginas 339-362

- Martig, J. e Mayer, G. P. (1973). *Diminished Hypercalcemic Response to Parathyroid extract in pre-partum cows*. Journal of Dairy Science, Volume 56, Páginas 1042-1046.
- Martín-Tereso, Javier e Martens, Holger (2014). *Calcium and Magnesium Physiology and Nutrition in Relation to the Prevention of Milk Fever and Tetany*. Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice, Volume 30, Páginas 643-670.
- Martínez, N; Risco, C. A.; Lima, F. S.; Bisinotto, R. S.; Greco, L. S.; Ribeiro, E. S.; Maunsell, F.; Galvão, K. e Santos, J. E. P. (2012) *Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease*. Journal of Dairy Science, Volume 95, Páginas 7158-7172
- Martinez, N; Sinedino, L. D. P.; Bisinotto, R. S.; Daetz, R.; Lopera, C.; Risco, C. A.; Galvão, K. N.; Thatcher, W. W.; e Santos, J. E. P. (2016) *Effects of oral calcium supplementation on mineral and acid-base status, energy metabolites, and health of postpartum dairy cows*. Journal of Dairy Science, Volume 99, Páginas 1-20
- Melendez, P., A. Donovan, C. A. Risco, M. B. Hall, R. Littell, and J. Goff. (2002) *Metabolic responses of transition Holstein cows fed anionic salts and supplemented at calving with calcium and energy*. Journal of Dairy Science, Volume 85, Páginas 1085–1092.
- Miesner, Matt D. e Aderson, David E. (2008). *Management of Uterine and Vaginal Prolapse in the Bovine*. Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice, Volume 24, Páginas 409-419
- Morales, M. S e Dehority, B. A. (2009). *Ionized calcium requirement of rumen cellulolytic bacteria*. Journal of Dairy Science, Volume 92, Páginas 5079-5091

- Murray, R. D., J. E. Horsfield, W. D. McCormick, H. J. Williams, and D. Ward. 2008. *Historical and current perspectives on the treatment, control and pathogenesis of milk fever in dairy cattle*. *Veterinary Record*, Páginas 561–565.
- Newton, C. D., & Nunamaker, D. M. (1985). *Calcium-Regulating Hormones and Metabolic Bone Disease*. *Textbook of Small Animal Orthopaedics*, Cap. 42 , Ithaca, EUA, Pages 1-17 (não tem isbn)
- Noakes, T. J. Parkinson, and G. C. W. England, ed. Saunders, Philadelphia (2001). *Dystocia and other disorders associated with parturition*. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8th ed. D. E., England, ISBN 9780702025563, Páginas 205–217
- Oetzel, Garret R. (2013). *Oral Calcium Supplementation in Peripartum Dairy Cows*. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, Páginas 447 – 454
- Oliveira, Marta Sofia Ribeiro (2011), a, Performance reprodutiva, produtiva e características comportamentais de vacas Holstein-Frísia em comparação com os respectivos cruzamentos com Montbéliarde e Vermelha Sueca. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, Página 28
- Oliveira, Tiago M. (2011) Influência da administração de Cálcio no pós-parto na prevalência de doenças do puépio em vacas de leite na ilha Terceira. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, Página 28
- 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*, Páginas 22–34

- Pehrson, B., and M. Jonsson. (1991) *Prevention of milk fever by oral administration of encapsulated Ca-salts*, Bovine Practitioner, Volume 26, Páginas 36–37.
- Pol, M., and P. L. Ruegg. (2007). *Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin*. Journal of Dairy Science, Volume 90, Páginas 249–261
- Polat, B., Colak, A., Cengiz, M., Yanmaz, L. E., Oral, H., Bastan, A., et al. (2010). *Sensitivity and specificity of infrared thermography in detection of subclinical mastitis in dairy cows*. Journal of Dairy Science, Volume 93, Páginas 3525–3532
- Proudfoot, K. L.; Huzzey, J. M. e von Keyserlingk, M. A. G. (2009) *The effect of dystocia on the dry matter intake and behavior of Holstein cows*. Journal of Dairy Science, Volume 92, Páginas 4937–4944
- Radostits, O. M., Gay, O. M., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (2007). Metabolic diseases. In *Veterinary Medicine*, Tenth edition, Edinburg: Saunders Elsevier, Scotland, ISBN 9780702027772, Páginas 1613-1688.
- Richardson, G. F.; Klemmer, A. D.; Knudsen, D. B. (1981) *Observations on uterine prolapse in beef cattle*. The Canadian Veterinary Journal, Volume 22, Páginas 189-191
- Risco, C. A.; Reynolds, J. P. e Hird, D (1984) *Uterine prolapse and hypocalcemia in dairy cows*. Journal of the American Veterinary Medical Association, Volume 185, Páginas 1517-1519
- Rodríguez, E.M.; A. Bach; M. Devant; A. Aris, *Is calcitonin an active hormone in the onset and prevention of hypocalcemia in dairy cattle?*, Journal of Dairy Science, Volume 99, Número 4, Páginas 3023-3030

- Rutherford, A. J.; Oikonomou, G. e Smith, R. F. (2016) *The effect of subclinical ketosis on activity at estrus and reproductive performance in dairy cattle*. Journal of Dairy Science, Volume 99, Páginas 4808-4815
- Sampson, J. D., J. N. Spain, C. Jones, and L. Carstensen. (2009) *Effects of calcium chloride and calcium sulfate in an oral bolus given as a supplement to postpartum dairy cows*. Veterinary Therapeutics, Volume 10, Páginas 131–139
- Schlumbohm, C. e Harmeyer, J.(2003) *Hypocalcemia Reduces Endogenous Glucose Production in Hyperketonemic Sheep*. Journal of Dairy Science, Volume 86, Páginas 1953-1962
- Shaver, R. D. (1997) *Nutritional Risk Factors in the Etiology of Left Displaced Abomasum in Dairy Cows: A Review*. Journal of Dairy Science, Volume 80, Páginas 2449-2453
- Sheehy, M. R.; Fahey, A. G.; Aungier, S. P. M.; Carter, F.; Crowe, M. A. e Mulligan F. J. (2017) *A comparison of serum metabolic and production profiles of dairy cows that maintained or lost body condition 15 days before calving*. Journal of Dairy Science, Volume 100, Número 1, Páginas 1-12
- Sheldon, I Martin, Lewis, G. S., LeBlanc, S., & Gilbert, R. O. (2006). *Defining postpartum uterine disease in cattle*. Theriogenology, Volume 65, Páginas 1516–1530
- Smith, Billy I. e Risco, Carlos A. (2005) *Management of Periparturient Disorders in Dairy Cattle*. Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice, Volume 21, Páginas 503-521
- Sordillo, L. M., and S. L. Aitken. 2009. *Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle*. Veterinary Immunology Immunopathology, Volume 128, Páginas 104–109

- Thilsing-Hansen, T., Jørgensen, R. J., & Østergaard, S. (2002). *Milk fever control principles: a review*, Acta Veterinaria Scandinavica, 43, Páginas 1–19.
- Tsiamadis, V.; Banos, G.; Panousis, N.; Kritsepi-Konstantinou, M.; Arsenos, G.; Valergakis, G. E. (2016) *Genetic parameters of calcium, phosphorus, magnesium, and potassium serum concentrations during the first 8 days after calving in Holstein cows*. Journal of Dairy Science, Volume 99, Páginas 5535- 5544
- Wallis, G. C., G. H. Kennedy, and R. H. Fishman. 1958. *The vitamin D content of roughages*. J. Anim. Sci. 17, Páginas 410–415
- Van Winden, S. C. L., C. R. Brattinga, K. E. Müller, J. P. T. M. Noordhuizen, and A. C. Beynen. (2002). *The position of the abomasum in dairy cows during the first six weeks after calving*. Veterinary Record, Volume 151, Páginas 446–449

Anexo I

Pressupostos da ANOVA mista

1. Normalidade de distribuição da variável cálcio em cada um dos grupos

Normalidade da distribuição testada através do teste de Shapiro-Wilk porque a dimensão de cada grupo é < 50

| | |
|---|--|
| Hipóteses estatísticas: H0: A variável cálcio tem distribuição normal H1: A variável cálcio não tem distribuição normal | Regra de decisão: Se $p \geq \alpha=0,05$ não se rejeita H0 Se $p < \alpha=0,05$ rejeita-se H0 |
|---|--|

Em todos os grupos e momentos de medições $p \geq \alpha=0,05$, logo não se rejeita H0, ou seja todos os grupos nos 3 momentos de medição apresentam distribuição normal.

| Teste de Normalidade | | | | |
|----------------------|-------|--------------|----|------|
| | Grupo | Shapiro-Wilk | | |
| | | Estatística | gl | p. |
| Cálcio 0h (mg/dl) | Z | ,986 | 19 | ,991 |
| | B2 | ,952 | 21 | ,371 |
| | B11 | ,901 | 19 | ,050 |
| | B1 | ,946 | 21 | ,281 |
| Cálcio 24h (mg/dl) | Z | ,948 | 19 | ,365 |
| | B2 | ,933 | 21 | ,157 |
| | B11 | ,924 | 19 | ,137 |
| | B1 | ,933 | 21 | ,159 |
| Cálcio 48h (mg/dl) | Z | ,971 | 19 | ,794 |
| | B2 | ,964 | 21 | ,600 |
| | B11 | ,958 | 19 | ,541 |
| | B1 | ,968 | 21 | ,694 |

2. Homogeneidade de variância entre os grupos nos vários momentos de recolha de cálcio

Homogeneidade de variância testada através do teste de Levene.

| | |
|---|--|
| Se $p \geq \alpha=0,05$ não se rejeita H0 Se $p < \alpha=0,05$ rejeita-se H0 | H0: Há homogeneidade de variância entre os grupos H1: Não há homogeneidade de variância entre os grupos |
|---|--|

$p \geq \alpha=0,05$ em todos os momentos de recolha de cálcio, logo não se rejeita H0, ou seja existe homogeneidade de variância entre os grupos em cada um dos 3 momentos de recolha de cálcio.

| Teste de Homogeneidade de Variância | | | | |
|-------------------------------------|-------------|-----|-----|------|
| | Levene | | | P |
| | Estatística | gl1 | gl2 | |
| Cálcio 0h (mg/dl) | ,312 | 3 | 76 | ,817 |
| Cálcio 24h (mg/dl) | 1,162 | 3 | 76 | ,330 |
| Cálcio 48h (mg/dl) | ,632 | 3 | 76 | ,597 |

3. Esfericidade - homogeneidade de variâncias das diferenças entre momentos

Esfericidade testada através do teste de Mauchly's W.

| | |
|---|-------------------------|
| Se $p \geq \alpha=0,05$ não se rejeita H0 | H0: Há esfericidade |
| Se $p < \alpha=0,05$ rejeita-se H0 | H1: Não há esfericidade |

Como $p < \alpha=0,05$ assume-se a não existência de esfericidade, tendo de se utilizar as correções Epsilon. No entanto como a média entre as correções Epsilon de Greenhouse-Geisser e Huynh-Feldt é maior que 0,75 ($0,834 + 0,884/2=0,859$) pode assumir-se a esfericidade.

| Mauchly's Test of Sphericity ^a Measure: HoraCálcio | | | | | | | |
|---|-------------|--------------------|----|------|----------------------|-------------|-------------|
| Within Subjects Effect | Mauchly's W | Approx. Chi-Square | df | Sig. | Epsilon ^b | | |
| | | | | | Greenhouse-Geisser | Huynh-Feldt | Lower-bound |
| Calcio | ,801 | 16,687 | 2 | ,000 | ,834 | ,884 | ,500 |

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. Design: Intercept + Grupo
Within Subjects Design: Calcio

b. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

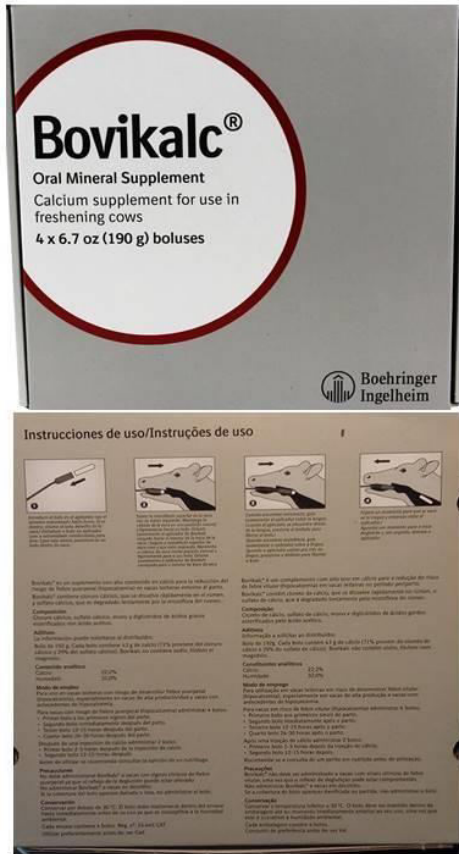
4. Normalidade dos resíduos (erros)

Normalidade das distribuições assumidas, uma vez que os resíduos apresentarem assimetrias ($Sk/EP < |3|$) e achatamentos ($Ku/EP < |3|$).

| Descriptives | | | | |
|-------------------------|----------|-------------|-------------|----------------|
| | | Estatística | Erro padrão | Estatística/EP |
| Residual for Calcio_0h | Skewness | -,688 | ,269 | -2,558 |
| | Kurtosis | ,711 | ,532 | 1,336 |
| Residual for Calcio_24h | Skewness | -,266 | ,269 | -0,989 |
| | Kurtosis | ,943 | ,532 | 1,773 |
| Residual for Calcio_48h | Skewness | -,313 | ,269 | -1,164 |
| | Kurtosis | -,079 | ,532 | -0,149 |

Anexo II

Bovikalc®



Bovikalc® é um complemento com alto teor em cálcio para a redução do risco de febre vitular (hipocalcemia) em vacas leiteiras no período periparto.

Bovikalc® contém cloreto de cálcio, que se dissolve rapidamente no rúmen, e sulfato de cálcio, que é degradado lentamente pela microflora do rúmen.

Composição
 Cloreto de cálcio, sulfato de cálcio, mono e diglicéridos de ácidos gordos esterificados pelo ácido acético.

Aditivos
 Informação a solicitar ao distribuidor.

Bolo de 192g. Cada bolo contém 43 g de cálcio (71% provém do cloreto de cálcio e 29% do sulfato de cálcio). Bovikalc não contém sódio, fósforo nem magnésio.

Constituintes analíticos

| | |
|-----------|-------|
| Cálcio: | 22,2% |
| Humidade: | 32,0% |

Modo de emprego
 Para utilização em vacas leiteiras em risco de desenvolver febre vitular (hipocalcemia), especialmente em vacas de alta produção e vacas com antecedentes de hipocalcemia.

Para vacas em risco de febre vitular (hipocalcemia) administrar 4 bolos:

- Primeiro bolo aos primeiros sinais de parto.
- Segundo bolo imediatamente após o parto.
- Terceiro bolo 12-15 horas após o parto.
- Quarto bolo 24-30 horas após o parto.

Após uma injeção de cálcio administrar 2 bolos:

- Primeiro bolo 2-3 horas depois da injeção de cálcio.
- Segundo bolo 12-15 horas depois.

Recomenda-se a consulta de um perito em nutrição antes de utilização.

Precauções
 Bovikalc® não deve ser administrado a vacas com sinais clínicos de febre vitular, uma vez que o reflexo de deglutição pode estar comprometido. Não administrar Bovikalc® a vacas em decúbito. Se a cobertura do bolo aparecer danificada ou partida, não administrar o bolo.

Conservação
 Conservar a temperatura inferior a 30 °C. O bolo deve ser mantido dentro da embalagem até ao momento imediatamente anterior ao seu uso, uma vez que este é suscetível à humidade ambiental. Cada embalagem contém 4 bolos. Consumir de preferência antes de: ver Val.

Anexo III

Protocolo laboratorial para medição de Ca total

ABX Pentra Calcium AS CP

A estabilidade da calibração é de 10 dias.

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

Instruções do teste^a:

3.xx

Fator de conversão:

mmol/L x 4,01 = mg/dL

Bibliografia

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

^aModificação: modificação das instruções do teste.

ABX Pentra Calcium AS CP

Estabilidade dos reagentes no sistema*:

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

Volume da amostra: 5 µL/teste

Limite de quantitação:

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

Limite de detecção:

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

Exatidão e Precisão:

■ Repetibilidade (precisão no mesmo ciclo)

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

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

■ Reprodutibilidade (precisão total)

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

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

*Modificação: modificação da estabilidade dos reagentes no equipamento.

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

Intervalo de medição:

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

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

Correlação:

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

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

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

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

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

Interferências:

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

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

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

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

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

pH: A urina não deve ser alcalinizada.

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

Estabilidade de calibração:

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

ABX Pentra Calcium AS CP

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

Intervalo de medição:

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

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

Correlação:

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

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

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

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

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

Estudo de comparação da matriz:

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

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

Interferências:

Hemoglobina: Não se observa influência significativa até 290 $\mu\text{mol/L}$ (500 mg/dL).

Lipémia: Não se observa influência significativa até uma concentração de Intralipid® (representativa de lipémia) de 500 mg/dL.

Bilirrubina total: Não se observa influência significativa até 788 $\mu\text{mol/L}$ (46,1 mg/dL).

Bilirrubina directa: Não se observa influência significativa até 445 $\mu\text{mol/L}$ (26,0 mg/dL).

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

Magnésio: Não se observa influência significativa até 4,42 mmol/L (10,7 mg/dL).

Acetaminofeno: Não se observa influência significativa até 1324 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/dL).

Ibuprofeno: Não se observa influência significativa até 2,42 mmol/L (50,1 mg/dL).

Ácido acetilsalicílico: Não se observa influência significativa até 3,62 mmol/L (65,2 mg/dL).

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

Estabilidade de calibração:

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

A estabilidade da calibração é de 10 dias.

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

Instruções do teste^a:

3.xx

Urina

Número de testes: 285 testes^d

^aModificação: modificação das instruções do teste.

^dModificação: novo número de testes.

ABX Pentra Calcium AS CP

Urina:

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

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

Armazenamento e Estabilidade

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

Gestão de resíduos

É favor consultar os requisitos da legislação local.

Precauções gerais ^c

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

Desempenho do ABX Pentra 400

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

Soro, plasma

Número de testes: 285 testes ^d

^aModificação: modificação das precauções gerais.

^bModificação: novo número de testes.

^cModificação: modificação da estabilidade dos reagentes no equipamento.

Estabilidade dos reagentes no sistema ^e:

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

Volume da amostra: 5 µL/teste

Limite de quantitação:

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

Limite de deteção:

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

Exatidão e Precisão:

- Repetibilidade (precisão no mesmo ciclo)

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

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

- Reprodutibilidade (precisão total)

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

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

ABX Pentra Calcium AS CP

Reagentes

ABX Pentra Calcium AS CP está pronto a utilizar.

Reagente:

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

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

Preparação

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

Calibrador

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

Controlo

Para controlo de qualidade interno, utilize:
ABX Pentra N Control, Ref. A11A01653 (não incluído)
10 x 5 mL (liofilizado)
ABX Pentra P Control, Ref. A11A01654 (não incluído)
10 x 5 mL (liofilizado)
ABX Pentra Urine Control L/H, Ref. A11A01674 (não incluído)
1 x 10 mL + 1 x 10 mL
Cada controlo deve ser analisado diariamente e/ou após a calibração.
A frequência dos controlos e os intervalos de confiança devem estar de acordo com as normas laboratoriais e com as diretivas específicas de cada país. Deve cumprir as diretrizes federais, estaduais e locais relativamente ao teste de controlo de qualidade dos materiais. Os resultados devem ficar dentro do intervalo dos limites de confiança definidos. Cada laboratório deve estabelecer o procedimento a seguir se os resultados excederem esses limites de confiança.

Materiais necessários mas não fornecidos

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

Amostra (8)

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

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

Os anticoagulantes que não estão presentes na lista não foram testados pela HORIBA Medical e, portanto, não são recomendados para utilização com este ensaio. Devem ser recolhidas amostras de urina em 24 horas, com HCl 6N (9). As urinas não acidificadas que foram refrigeradas devem ser acidificadas e/ou aquecidas a 56°C por 15 minutos para redissolver os precipitados.

Estabilidade da amostra (8):

Soro/plasma:

- por até 7 dias a 20-25°C.
- por até 3 semanas a 4-8°C.
- por até 8 meses a -20°C.

Urina:

- por até 2 dias a 20-25°C.
- por até 4 dias a 4-8°C.
- por até 3 semanas a -20°C.

Intervalo de referência (2)

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

Soro/Plasma:

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

ABX Pentra Calcium AS CP

■ ABX Pentra 400

2015/02/20
ABSA01290CPT

REF A11A01954

REAGENT 90 mL



IVD CE

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

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

Instruções do teste

Soro, plasma: CaAS^a

3.xx

Urina: CaU_AS^a

3.xx

Utilização^b

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

Interesse clínico (1, 2, 3)

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

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

Método (4, 5, 6, 7)

Vários métodos colorimétricos para a determinação do cálcio já foram utilizados no passado. Connerty e Briggs descreveram métodos que usavam alizarina 3-sulfonato (4) e cresoltaleína complexona (5) enquanto Ginder e King descreveram um método que usava azul de timol (6). Já foram feitas várias modificações posteriores a estes métodos. O método utilizado aqui baseia-se no metalocromogénio Arsenazo III. Os iões de cálcio (Ca^{2+}) reagem com o Arsenazo III (2,2'-[1,8-Diidroxi-3,6-disulfoaftileno-2,7-bisazo]-ácido bisbenzenoarsónico) ao pH 6,75 para formar um cromóforo na coloração púrpura intensa. A absorvância do complexo Ca-Arsenazo III é medida bicromaticamente a 660/700 nm.

O aumento resultante na absorvância desta mistura da reacção é directamente proporcional à concentração de cálcio presente na amostra. O Arsenazo III possui alta afinidade ($K^2 = 1 \times 10^{-7}$) com os iões de cálcio (7) e não apresenta interferência de outros cátions normalmente presentes no soro, plasma ou urina.



^aModificação: modificação das instruções do teste.

^bModificação: modificação do volume do reagente.