



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

KELI DAIANE CRISTINA LIBARDI RAMELLA

**HIPOCALCEMIA SUBCLÍNICA EM VACAS LEITEIRAS  
RECÉM-PARIDAS:  
EFEITOS DO TRATAMENTO ORAL COM CÁLCIO E DA DIETA  
ANIÔNICA**

---

Londrina  
2020

KELI DAIANE CRISTINA LIBARDI RAMELLA

**HIPOCALCEMIA SUBCLÍNICA EM VACAS LEITEIRAS  
RECÉM-PARIDAS:  
EFEITOS DO TRATAMENTO ORAL COM CÁLCIO E DA DIETA  
ANIÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal da Universidade Estadual de  
Londrina como requisito parcial para a obtenção do  
título de Doutora.

Orientador: Dr. Júlio Augusto Naylor Lisbôa

Londrina  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

K29h Ramella, Keli Daiane Cristina Libardi.  
Hipocalcemia subclínica em vacas leiteiras recém-paridas: efeitos do tratamento oral com cálcio e da dieta aniônica / Keli Daiane Cristina Libardi Ramella. - Londrina, 2020.  
83 f. : il.

Orientador: Júlio Augusto Naylor Lisbôa.  
Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2020.  
Inclui bibliografia.

1. Bovinos leiteiros - Tese. 2. Cálcio oral - Tese. 3. Hipocalcemia subclínica - Tese. 4. Período de transição - Tese. I. Lisbôa, Júlio Augusto Naylor . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

KELI DAIANE CRISTINA LIBARDI RAMELLA

**HIPOCALCEMIA SUBCLÍNICA EM VACAS LEITEIRAS RECÉM-  
PARIDAS:  
EFEITOS DO TRATAMENTO ORAL COM CÁLCIO E DA DIETA  
ANIÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal da Universidade Estadual de  
Londrina como requisito parcial para a obtenção do  
título de Doutora.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Júlio Augusto Naylor Lisboa  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dra. Karina Keller Marques da Costa Flaiban  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dra. Priscilla Fajardo Valente Pereira  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dra. Thais Helena Constantino Patelli  
Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP

---

Prof. Dr. Luiz Fernando Coelho da Cunha Filho  
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 28 de fevereiro de 2020.

*Dedico de forma muito especial esse trabalho ao  
meu filho João Victor Ramella e ao meu esposo  
João Ricardo Ramella. Sem vocês eu não  
conseguiria realizar esse sonho!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, pela saúde, pelas bênçãos de cada dia, e pela certeza de sua presença me protegendo e iluminando meu caminho, e permitindo finalizar mais uma etapa importante da minha vida.

A toda minha família, em especial ao meu esposo João Ricardo Pompermaier Ramella e ao meu pequeno João Victor Ramella, por todo apoio, amor, carinho, pela paciência e compreensão nos momentos de ausência. Amo vocês!

Ao meu orientador Professor Dr. Júlio Augusto Naylor Lisbôa não somente pela constante orientação neste trabalho e pelos inúmeros ensinamentos nesses quatro anos, mas sobretudo pela sua amizade e exemplo de profissional humano e ético.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e a todos os docentes que tive a honra de conviver nesses quatro anos, que contribuíram grandemente para o crescimento pessoal e profissional.

Ao laboratório de patologia clínica do Hospital Veterinário - UEL, em especial a Prof. Dra. Karina Keller Marques da Costa Flaiban que auxiliaram na condução dos trabalhos laboratoriais, mostrando sempre carinho e dedicação ao ensino e a pesquisa.

Ao colega Luis Gabriel Cucunubo que auxiliou em todo o planejamento e execução do projeto de pesquisa, colaborando na tomada de decisões e contribuindo da melhor forma possível. Obrigada por compartilhar a sua experiência!

As colegas e grandes amigas Paula Massini e Nádia Weinert que estiveram comigo nesses quatro anos de doutorado, dividindo angústias, medos, felicidades e vitórias. Vocês foram muito importantes!

Agradeço de coração a minha grande amiga Ana Cláudia Lucena, por todo o auxílio e apoio durante essa caminhada, sempre acolhendo com carinho meu pequeno João Victor para que eu pudesse realizar esse sonho!

A minha amiga e colega de trabalho Camila Bizarro, por toda força, apoio e carinho. Agradeço também a minha amiga Roberta Chideroli, pelo apoio, carinho e acolhimento em sua casa principalmente nos últimos anos de doutorado.

Aos funcionários da Fazenda Lactobom, Leila, Dalva, Simonia, Bruno, Clóvis e Edson, obrigada por todo o auxílio na execução desse trabalho e pela amizade construída nos meses de estudo a campo.

A Bayer Saúde Animal, pelo apoio na execução desse estudo.

A todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu muito obrigado!

### **Agências de Financiamento**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil PROEX/CAPES: projeto número 1959/2015, via Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina – UEL.

CNPq – INCT Leite: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Cadeia Produtiva do Leite (465725/2014-7).

*“Que Deus nos dê forças para mudar as coisas que podem ser mudadas. Serenidade para aceitar as coisas que não podemos mudar e sabedoria para perceber a diferença. Mas nos dê, sobretudo coragem para não desistir daquilo que pensamos estar certo.”*

*Chester W. Nimitz*

RAMELLA, Keli Daiane Cristina Libardi. **Hipocalcemia subclínica em vacas leiteiras recém-paridas**: efeitos do tratamento oral com cálcio e da dieta aniônica. 2020. 83f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

O período de transição é um momento crítico e decisivo para a saúde da vaca leiteira, que, acompanhado por significantes mudanças endócrinas ao parto e falhas na homeostasia, provocam as doenças da produção. Como estratégias preventivas, diversos autores relatam o uso de sais aniônicos e fontes de cálcio via oral no pós-parto imediato. O formiato de cálcio (Ca) é a fonte de cálcio oral mais recentemente introduzida no Brasil, e estudos são necessários para avaliar seus efeitos no período de transição pós-parto de vacas leiteiras. Desse modo, foram realizados dois estudos em rebanho leiteiro do Oeste paranaense. No primeiro estudo, os objetivos foram avaliar os efeitos da administração oral do formiato de Ca no pós-parto imediato de vacas leiteiras de alta produção sobre a calcemia e outros marcadores bioquímicos sanguíneos, e sobre a ocorrência de doenças no início da lactação. Cento e vinte vacas holandesas recém-paridas foram divididas de acordo com a ordem de lactação (primeira, segunda, terceira, e quarta a sexta lactação) e com a administração oral de formiato de cálcio (controle e tratados), compondo 8 grupos (n=15). Concentrações de Ca total, fósforo, magnésio, betahidroxibutirato, ácidos gráxos não-esterificados, glicose, proteínas totais, albumina, ureia, e a atividade de aspartato aminotransferase e gama-glutamilttransferase foram determinadas em amostras colhidas ao parto (0h), 24, 48, 72 e 96h após. O ponto de corte para admissão de hipocalcemia subclínica (HS) foi a calcemia de 8,5 mg/dL. O segundo estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da dieta aniônica pré-parto sobre o equilíbrio eletrolítico e sobre a calcemia de vacas leiteiras e verificar o impacto sobre a HS. Foram incluídas as sessenta vacas não tratadas com o formiato de cálcio oral do estudo anterior e realizaram-se as determinações séricas de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>, Ca total e SID<sub>3</sub>. ANOVA de medidas repetidas bifatorial e teste de qui-quadrado foram empregados para as comparações. Os resultados sugerem no primeiro estudo que a ordem de lactação não apresentou influência para as variáveis estudadas, exceto a calcemia mais alta nas primíparas. O Ca sérico foi menor até 24h e elevou-se a partir de 48h e a HS foi mais frequente nas vacas multíparas. A administração oral de formiato de Ca após o parto e 24 horas depois não produziu efeito sobre a calcemia e demais variáveis nos primeiros dias pós-parto e não reduziu as ocorrências de HS e outras doenças. Não se justifica, portanto, como medida preventiva a ser adotada indiscriminadamente em rebanhos leiteiros, sendo necessário outros estudos para o esclarecimento dos efeitos do tratamento em grupos de risco específicos. No segundo estudo, os resultados comprovaram que a ingestão de dieta aniônica pré-parto com alto teor de cloreto provocou acidose hiperclorêmica e este desequilíbrio se reverteu no segundo dia pós-parto. Os efeitos induzidos sobre os equilíbrios eletrolítico e ácido base não foram capazes de prevenir a ocorrência de HS nos primeiros dias da lactação. A administração de cálcio oral após o parto e a ingestão de dietas aniônicas no pré-parto não podem ser admitidas como medidas preventivas eficazes para a hipocalcemia subclínica em vacas leiteiras de alta produção recém-paridas.

**Palavras-chave:** Formiato de cálcio. Bovinos leiteiros. Doenças puerperais. Período de transição. Dieta acidogênica.

RAMELLA, Keli Daiane Cristina Libardi. **Subclinical hypocalcemia in fresh dairy cows: effects of oral treatment with calcium and anionic diet.** 2020. 83f. Thesis (Doctor's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## ABSTRACT

The transition period is a critical and decisive moment for the health of dairy cows, which, accompanied by significant endocrine changes at birth and failures in homeostasis, cause production diseases. As a preventives strategies, several authors report the use of anionic salts and calcium sources orally in the immediate postpartum period. Calcium formate (Ca) is the most recently introduced oral calcium source in Brazil, and studies are needed to evaluate its effects in the postpartum transition period of dairy cows. Thus, two studies were carried out on a dairy herd in western Paraná. In the first study, the objectives were to evaluate the effects of oral Ca formate administration in the immediate postpartum of high production dairy cows on calcemia and other blood biochemical markers, and on the occurrence of diseases at the beginning of lactation. One hundred and twenty fresh Holstein cows were divided according to the lactation order (first, second, third, and fourth to sixth lactation) and with the oral calcium formate administration (control and treated), composing 8 groups (n = 15). Concentrations of total Ca, phosphate, magnesium, betahydroxybutyrate, non-esterified fatty acids, glucose, total proteins, albumin, urea, and aspartate aminotransferase and gamma-glutamyltransferase activity were determined in samples collected at birth (0h), 24, 48, 72 and 96h after. The cut-off point for admission of subclinical hypocalcemia (SH) was calcemia of 8.5 mg/dL. The second study aimed to evaluate the effects of the anionic prepartum diet on electrolyte balance and on dairy cow calcemia and to verify the impact on SH. Sixty cows not treated with the oral calcium formate from the previous study were included and serum measurements of Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>, total Ca and SID<sub>3</sub> were performed. Two-way repeated measures ANOVA and chi-square test were used for comparisons. The results suggest in the first study that the lactation order had no influence on the variables studied, except for the highest calcemia in primiparous cows. Serum Ca was lower up to 24h and increased after 48h and SH was more frequent in multiparous cows. Oral administration of Ca formate after delivery and 24 hours later had no effect on calcemia and other variables in the first postpartum days and did not reduce the occurrences of SH and other diseases. Therefore, it is not justified as a preventive measure to be adopted indiscriminately in dairy herds, requiring further studies to clarify the effects of treatment in specific risk groups. In the second study, the results proved that the intake of a anionic prepartum diet with a high chloride content caused hyperchloremic acidosis and this imbalance was reversed on the second postpartum day. The effects induced on electrolyte and base acid balance were not able to prevent the occurrence of SH in the first days of lactation. The administration of oral calcium after calving and the ingestion of anionic diets in the pre-partum period cannot be accepted as effective preventive measures for SH in newly calved high producing dairy cows.

**Key words:** Calcium formate. Dairy cattle. Postpartum diseases. Transition period. Acidogenic diet.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Figura 1</b> – Mecanismo de transporte gastrointestinal de cálcio (Ca). .....	18
<b>Figura 2</b> – Mecanismo de absorção renal de cálcio (Ca).....	19
<b>Figura 3</b> – Cascata de eventos decorrentes da Hipocalcemia .....	23

### ARTIGO A

<b>Figura 1</b> – Variação da calcemia (média e desvio-padrão), ao longo dos cinco primeiros dias de lactação (expressos em horas), em vacas holandesas de alta produção, de segunda à sexta lactação, que receberam (n=45) ou não (n=45) tratamento com formiato de cálcio oral no pós-parto.....	50
--	----

### ARTIGO B

<b>Figura 1</b> – Variação da calcemia, nas primeiras 96 horas de lactação, de vacas holandesas de alta produção divididas de acordo com a ordem de lactação (n=15 cada) e que receberam dieta aniônica antes do parto.....	70
---	----

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO A

- Tabela 1** – Composição das dietas oferecidas nos períodos pré-parto e pós-parto, e valores recomendados pelo NRC (2001) para vacas leiteiras holandesas de alta produção ..... 48
- Tabela 2** – Concentrações médias de cálcio total (mg/dL), no soro sanguíneo de vacas holandesas de alta produção, de diferentes ordens de lactação, nos cinco primeiros dias de lactação, tratadas ou não com formiato de cálcio oral após o parto. Efeitos do tratamento, do tempo pós-parto e interação entre os dois fatores..... 50
- Tabela 3** – Concentrações médias de fosfato ( $PO_4$ ), magnésio (Mg), ácidos graxos não-esterificados (AGNE), betahidroxibutirato (BHB), glicose, proteínas totais (PT), albumina (Alb), e ureia, e atividades de aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT) no soro sanguíneo de vacas holandesas de alta produção nos cinco primeiros dias de lactação, tratadas (n=60) ou não (n=60) com formiato de cálcio oral após o parto. Efeitos do tratamento, do tempo pós-parto e interação entre os dois fatores..... 51
- Tabela 4** – Ocorrências observadas em vacas holandesas de alta produção no início da lactação tratadas ou não com formiato de cálcio oral após o parto ..... 52
- Tabela 5** – Ocorrências observadas em vacas holandesas de alta produção no início da lactação que desenvolveram hipocalcemia subclínica ou que se mantiveram normocalcêmicas independente de terem sido tratadas com formiato de cálcio oral após o parto. .... 53

## LISTA DE QUADROS

### ARTIGO B

- Quadro 1** – Composição das dietas oferecidas nos períodos pré-parto e pós-parto, e valores recomendados pelo NRC (2001) para vacas leiteiras holandesas de alta produção ..... 67
- Quadro 2** – Valores médios das concentrações de sódio ( $\text{Na}^+$ ), de potássio ( $\text{K}^+$ ), de cloretos ( $\text{Cl}^-$ ) e de cálcio total (Ca) e da diferença de íons fortes ( $\text{SID}_3$ ) no soro sanguíneo de vacas holandesas de alta produção nos cinco primeiros dias de lactação e que receberam dieta aniônica antes do parto. Efeitos da ordem de lactação e dos momentos após o parto, e interação entre os dois fatores ..... 69
- Quadro 3** – Ocorrência de hipocalcemia (concentração de cálcio no soro sanguíneo  $< 8,5$  mg/dL) em vacas holandesas de alta produção nos cinco primeiros dias de lactação e que receberam dieta aniônica antes do parto..... 70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Alb	Albumina
AST	Aspartato Aminotransferase
BHB	Betahidroxibutirato
Ca	Cálcio
Cl	Cloro
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CMT	<i>California Mastitis Test</i>
DAE	Deslocamento de abomaso a esquerda
DCAD	Diferença cátion- aniônica da dieta
DIM	Dias em lactação ( <i>days in milk</i> )
ECC	Escore de condição corporal
FDA	Fibra detergente ácida
FDN	Fibra detergente neutra
GGT	Gama glutamiltransferase
HPB	Vacas Holandesas preta e branca
HS	Hipocalcemia subclínica
K	Potássio
Mg	Magnésio
MS	Matéria seca
Na	Sódio
NEFA	Ácidos graxos não-esterificados
NRC	National Research Council
PO <sub>4</sub>	Fosfato
PPH	Paresia Puerperal hipocalcêmica
PT	Proteínas totais
PTH	Paratormônio
RTM	Ração totalmente misturada
S	Enxofre
SID <sub>3</sub>	Diferença de íons fortes ( <i>Strong Ion Difference</i> )
UEL	Universidade Estadual de Londrina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1	METABOLISMO DO CÁLCIO E DESAFIOS METABÓLICOS DA VACA LEITEIRA .....	16
2.2	HIPOCALCEMIA CLÍNICA X HIPOCALCEMIA SUBCLÍNICA .....	20
2.3	HIPOCALCEMIA E DOENÇAS PUERPORAIS .....	23
2.4	ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO DA HIPOCALCEMIA .....	24
2.4.1	Monitoramento de minerais nas dietas .....	25
2.4.2	Dietas aniônicas e Balanço entre Cátions e Ânions da dieta (BCAD) .....	26
2.4.3	Suplementação de Vitamina D no pré-parto.....	28
2.4.4	Suplementação de cálcio oral como medida preventiva.....	29
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31
<b>4</b>	<b>HIPÓTESES</b> .....	38
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	39
5.1	OBJETIVO GERAL .....	39
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
<b>6</b>	<b>ARTIGO A – Efeito do tratamento com formiato de cálcio oral após o parto sobre a calcemia, metabólitos séricos e ocorrência de doenças no início da lactação de vacas leiteiras de alta produção</b> .....	40
<b>7</b>	<b>ARTIGO B – Dieta aniônica pré-parto provoca acidose hiperclorêmica em vacas leiteiras de alta produção mas não evita a hipocalcemia subclínica</b> .....	62
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	79
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	80
	<b>ANEXOS</b> .....	82
	ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética no uso de animais dos artigos A e B .....	83

## 1 INTRODUÇÃO

O período de transição de vacas leiteiras, principalmente em animais de alta produção, também conhecido como periparto é caracterizado por mudanças repentinas, tanto de caráter endócrino quanto nutricional, que desencadeiam a ativação de mecanismos homeostáticos em decorrência da redistribuição de nutrientes. De acordo com Goff (2014) esses mecanismos estão intimamente ligados ao metabolismo da proteína e da energia, e também relacionado com a manutenção das concentrações sanguíneas de alguns minerais, como o cálcio (Ca), o fósforo (P) e o magnésio (Mg). Quando há um desequilíbrio desses mecanismos, devido principalmente a nutrição deficiente no período pré-parto, ocorre então os desequilíbrios metabólicos, entre os quais está a hipocalcemia e acetonemia, e secundariamente doenças como a retenção de placenta, o deslocamento de abomaso, a mastite, a metrite e a endometrite (LeBLANC *et al.*, 2006; CHAPINAL *et al.*, 2011; MARTINEZ *et al.*, 2012). Minimizar a gravidade, os efeitos adversos e a incidência da hipocalcemia no pós-parto de vacas leiteiras é o grande desafio no início da lactação (FARNIA *et al.*, 2018).

Dentre os distúrbios de ordem metabólico-nutricional, a hipocalcemia apresenta-se de duas formas, a forma clínica, com ocorrência média nos rebanhos leiteiros de 3 a 15%, e a forma subclínica, com relatos de até 50% de casos em um rebanho (REINHARDT *et al.*, 2011). A hipocalcemia ocorre em fêmeas no puerpério devido ao desequilíbrio de cálcio no organismo e apresenta correlação com a idade e com o padrão racial (OETZEL, 2013). A idade ou o número de lactações do animal influencia, sobremaneira, na sua capacidade em responder ao aumento da demanda de cálcio. Em vacas mais velhas, a desmineralização óssea, próximo ao parto, é mais reduzida do que nas novilhas. Isto porque os osteoblastos são o único tipo celular ósseo a expressar proteínas receptoras para  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  e, com o aumento da idade do animal, ocorre uma diminuição do número desse tipo de célula, diminuindo, assim, a habilidade do osso em contribuir para a manutenção da calcemia (GOFF, 2014; LENO *et al.*, 2018). Outro fator intrínseco do animal que influencia diretamente na ocorrência da hipocalcemia é a raça. Entre as raças bovinas mais susceptíveis está a Jersey, isto devido às altas concentrações de Ca no colostro e no leite e também devido a quantidade reduzidas de receptores para o Ca nesse agrupamento genético. Da mesma forma, animais da raça holandesa principalmente de alta produção leiteira são altamente acometidos devido as quantidades elevadas de leite produzidos, o que se agrava com o aumento do número de lactações (GONZÁLEZ, SILVA, 2017).

Além de prejuízos devido à mortalidade, a hipocalcemia pode causar outros agravos relacionados à redução da ingestão de matéria seca, à produção de leite, à perda de peso, à contração muscular diminuída, à redução da resposta imune e vida útil do animal em três a quatro anos (KIMURA *et al.*, 2006; MARTINEZ *et al.*, 2012). Dessa forma, as vacas têm maior propensão a outras enfermidades pós-parto, como retenção de placenta, metrite, deslocamento de abomaso, mastite e cetose (JOYCE *et al.*, 1997; GOFF, 2008; JAWOR *et al.*, 2012; MARTINEZ *et al.*, 2016). Diante da intensa mobilização de Ca no periparto (para o feto, para a formação do colostro ou secreção de leite), somente é possível manter os níveis circulantes de Ca (70-80g/dia) por meio de uma maior eficiência na absorção intestinal e/ou pelo aumento da absorção óssea (GOFF, 2014), fato que contribui consideravelmente com a ocorrência da hipocalcemia.

A busca por novos métodos que previnam a hipocalcemia no pós-parto de vacas leiteiras de alta produção possui caráter crescente no meio científico. Como estratégia profilática para a hipocalcemia, pesquisadores têm trabalhado unindo conhecimentos científicos e práticas viáveis para diferentes rebanhos, destacando-se o uso de sais aniônicos, o balanço nutricional com diferentes tipos de alimentos, a suplementação de vitamina D e a utilização de cálcio administrado oralmente. Sendo assim, utilizando mecanismos que previnem a diminuição das concentrações de Ca na corrente sanguínea (FARNIA *et al.*, 2018; CARNEIRO, 2018).

Até pouco tempo as principais técnicas utilizadas objetivando reduzir e/ou prevenir a hipocalcemia estavam relacionadas com a diminuição nas concentrações de cálcio e fósforo na dieta no período pré-parto, aumentando as concentrações sanguíneas de vitamina D e PTH (paratormônio). Dentre as medidas atuais que objetivam diminuir a incidência de hipocalcemia subclínica no pós-parto, destacam-se a incorporação de sais aniônicos nas dietas pré-parto, com base em cloretos e sulfatos, e a administração de sais de Ca por via oral após o parto. Dentre as formulações orais para tal finalidade, destaca-se o cloreto de cálcio, sulfato de cálcio, carbonato de cálcio e propionato de cálcio, administrados isolados ou não (OETZEL, 2013; BLANC *et al.*, 2014; MARTINEZ, *et al.*, 2016). O formiato de cálcio oral, introduzido recentemente no Brasil, tem sido utilizado estrategicamente com a finalidade de prevenir distúrbios relacionados ao cálcio e por consequência, reduzir as doenças associadas a hipocalcemia (CARNEIRO, 2018; WILMS *et al.*, 2019), no entanto, os resultados ainda são incipientes. Com isso, o presente estudo teve como propósito avaliar a suplementação oral de cálcio e o uso da dieta aniônica sob a calcemia e parâmetros bioquímicos, e o impacto na ocorrência das doenças no início da lactação de vacas leiteiras de alta produção.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 METABOLISMO DO CÁLCIO E DESAFIOS METABÓLICOS DA VACA LEITEIRA

O final do período gestacional e o início da lactação em vacas leiteiras, também conhecido como período de transição, implicam em mudanças drásticas no estado metabólico-nutricional, de modo que há necessidade de alta demanda de cálcio (Ca) para suprir as necessidades fisiológicas do parto, para a formação do feto e do colostro, e para a síntese do leite com o advento da nova lactação (GOFF, 2008; 2014). Muitas vezes os animais não conseguem se adaptar e acabam desenvolvendo transtornos metabólicos, as então chamadas “doenças da produção”. Neste contexto, a hipocalcemia, é caracterizada pelo rápido declínio das concentrações de Ca no sangue nos primeiros dias após o parto, além disso, tem sido o desequilíbrio metabólico mais recorrente em rebanhos leiteiros de alta produção (REINHARDT *et al.*, 2011; OETZEL, MILLER, 2012).

O Ca é o principal mineral do esqueleto e um dos cátions mais abundantes no organismo, representando cerca de 2% do peso corporal. A nível celular o Ca é controlado com precisão, sendo que nos espaços extracelulares o Ca deve ser mantido em níveis constantes para suprir as funções fisiológicas (CASE *et al.*, 2007). Sabe-se que uma vaca adulta contém aproximadamente 10 kg de Ca, dos quais 98% estão alocados nos seus ossos, e o restante no espaço extracelular. Muitas funções celulares precisam ser supridas por uma regulação de cátions, e isto é conseguido pela regulação da absorção gastrointestinal, pela reabsorção renal e pela troca com tecido ósseo (THE BAULT *et al.*, 2006).

De acordo com Horst (1986) e Goff (2006), o sistema de regulação do cálcio nos mamíferos é controlado principalmente pela ação hormonal, este é também o caso dos bovinos, no entanto, os ruminantes possuem diferenças específicas principalmente relacionadas a absorção desse mineral no sistema digestivo. Entretanto, os mecanismos de regulação do Ca demoram em média 72 horas para se tornarem ativos, por isso o aumento súbito da demanda do mineral no início da lactação faz com que esse sistema não consiga suprir suas necessidades de cálcio (GOFF, 2008). A concentração de cálcio total (Ca) e cálcio ionizável (iCa) em vacas de leite deve ser mantida no soro ou plasma sanguíneo com os valores entre 8,5 a 10,5 mg/dL, e 4,5 a 5,5 mg/dL, respectivamente (GOFF, HORST, 1997; JAWOR *et al.*, 2012; OETZEL, 2013). Mais importante que a concentração de Ca total é a concentração de iCa, já que esta é a forma biologicamente ativa do cálcio e prontamente utilizável pelos ruminantes (GOFF, 2014), entretanto, a pronta disponibilidade de

equipamentos e os custos relacionados ao seu monitoramento, dificultam a mensuração na rotina de fazendas leiteiras.

Os níveis de cálcio sérico no organismo são mantidos através da interação do paratormônio (PTH), da calcitonina (CT) e da forma ativa da vitamina D (JONES *et al.*, 2000). Vários hormônios como cortisol, tiroxina (T<sub>4</sub>), estradiol (E<sub>2</sub>), hormônio do crescimento (GH) e andrógenos podem também interagir no mecanismo homeostático do cálcio (LUCA, MELANCON, 1972). O controle da homeostase do Ca no organismo se dá principalmente pelas glândulas paratireoides, que são responsivas às baixas concentrações de iCa no sangue e respondem secretando o PTH, que tem como principal alvo inicial os osteoblastos e células tubulares renais (GOFF, 2014). Além disso, sob condições adversas às baixas concentrações de Ca, o calcitriol responde sinalizando às proteínas mediadoras da absorção intestinal junto aos enterócitos. Os receptores na membrana celular de suas respectivas células são capazes de perceber se concentrações de iCa no sangue estão adequadas ou não, e se necessário, ativar os mecanismos de síntese de PTH, calcitonina e calcitriol (WILKENS, *et al.*, 2020).

Quando há um decréscimo de Ca sérico, a glândula paratireoide é estimulada a secretar o PTH. Este hormônio ativa a enzima renal 1- $\alpha$ -hidroxilase, a qual catalisa a transformação de 25-hidroxi-colecalciferol em 1,25-(OH)<sub>2</sub>D, a forma ativa da vitamina D. A vitamina D pode ser ingerida sob a forma vegetal, o ergocalciferol (D<sub>2</sub>) ou sob a forma animal, o colecalciferol (D<sub>3</sub>), ou ainda ser sintetizada na epiderme a partir do 7-dehidro-colesterol (DUKES, REECE, 2006). Após potencializada, essa vitamina irá promover o aumento de síntese de RNA mensageiro, estimulando a produção de proteína-carreadora de cálcio junto aos enterócitos (RUDE, 1998). Posteriormente ao estímulo da proteína carreadora, a absorção de Ca ocorre principalmente no intestino delgado de ruminantes, apesar de também ocorrer alguma absorção no rúmen, no ceco e no cólon. A passagem pelo abomaso e início do duodeno, promove uma queda de pH da ingesta, fazendo com que o Ca saponificado no rúmen e retículo, seja liberado e fique na forma de iCa, disponível para a absorção intestinal (SANTOS *et al.*, 2010; GOFF, 2014).

A absorção de cálcio através do epitélio intestinal e renal ocorre via transcelular e intracelular, e depende diretamente do gradiente de concentração com regulação limitada, embora haja pequena permeabilidade epitelial. Quando os níveis séricos de Ca diminuem no pós-parto, a absorção intestinal se inicia dentro de poucos minutos, no entanto com limitação da quantidade de cálcio absorvida e da duração do efeito em relação a fonte de cálcio ofertada (OETZEL, 2013; CARNEIRO, 2018). Após a absorção, o transporte

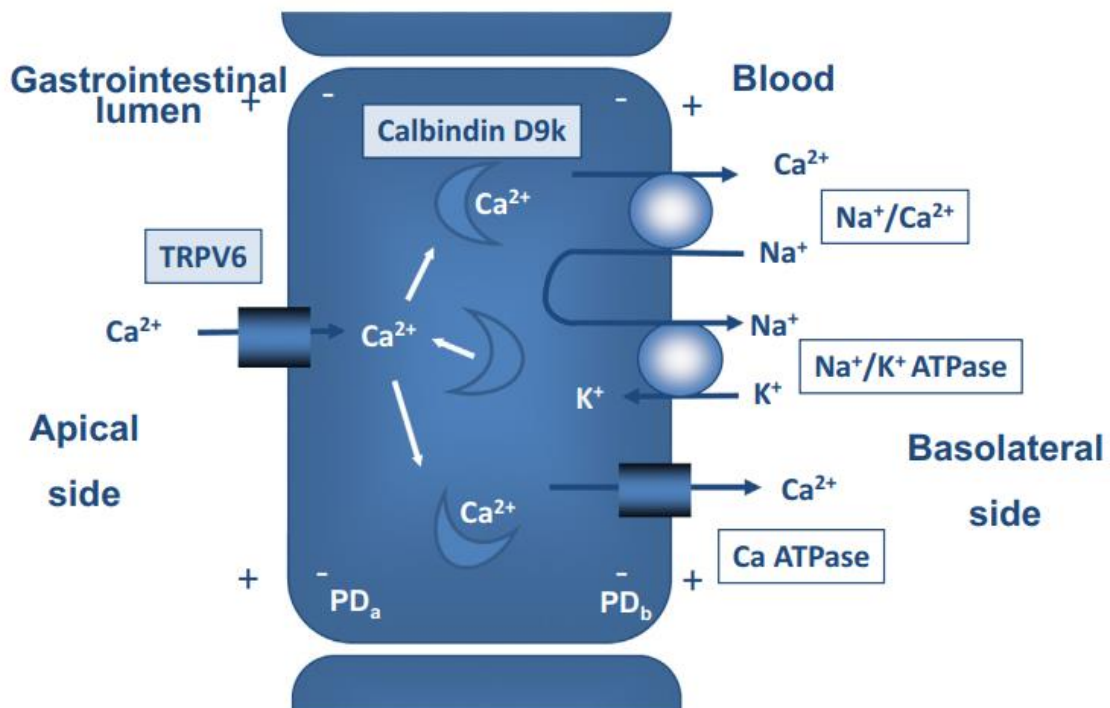
gastrointestinal do Ca opera contra o gradiente de concentração, e por isso requer gasto de energia, ocorrendo basicamente em 3 etapas (Figura 1):

1ª Etapa - Entrada de Ca para a célula no intestino delgado: Os canais de cálcio controlam a entrada passiva de Ca para o citosol celular. Esses canais são modulados pela proteína carreadora TRVP6 gastrointestinal, sendo que a expressão destas proteínas é controlada pelo calcitriol e sofre a influência da quantidade de cálcio disponível para absorção (BOUILLON *et al.*, 2003; MARTÍN-TERESO, MARTENS, 2011).

2ª Etapa – A segunda etapa ocorre no citosol celular em que a difusão de Ca é conseguida pela proteína de ligação citosólica Calbindina-D9K, a qual é controlada pela ação hormonal do calcitriol (BRONNER, 2003; PÉREZ *et al.*, 2008).

3ª Etapa – Translocação de Ca para a membrana basolateral, exportando os íons de Ca para o sangue com um custo de energia pela Ca ATPase e pela troca de íons (WILKENS *et al.*, 2020).

**Figura 1** – Mecanismo de transporte gastrointestinal de cálcio (Ca).



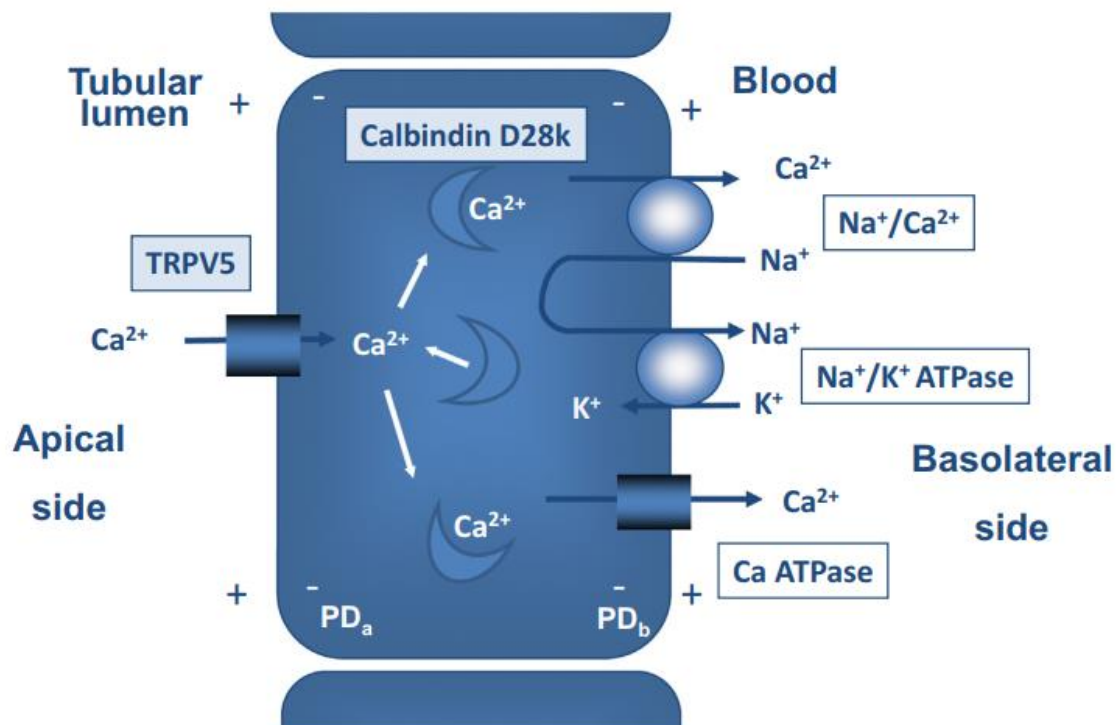
**Fonte:** Martín-Tereso, Martens (2014).

O epitélio ruminal caracterizado por múltiplas camadas densas é um fator que implica na quantidade significativa de Ca que pode ser absorvida no compartimento. Em

condições de aumento drástico nas concentrações de Ca luminal como no caso da administração em bolus, esse efeito parece não ocorrer (WILKENS *et al.*, 2012b).

Já absorção renal de cálcio possui certas diferenças moleculares e também em relação ao controle hormonal. Esse processo no túbulo distal renal ocorre também contra o gradiente de concentração e depende diretamente do gasto de energia. Nesse caso, o cálcio adentra na célula por intermédio do canal receptor TRPV5 que é acionada pela sinalização do PTH e posteriormente difundida pela célula mediada pela proteína de ligação Calbindina-D28k até a membrana basolateral (VAN ABEL *et al.*, 2005; KHANAL *et al.*, 2008; WILKENS *et al.*, 2020) (Figura 2).

**Figura 2** – Mecanismo de absorção renal de cálcio (Ca).



**Fonte:** Martín-Tereso, Martens (2014).

A mobilização de Ca ósseo é um fator crítico para muitas espécies durante a lactação, devido principalmente a perda constante de Ca pelo leite e a incapacidade de manutenção da homeostase de Ca (KOVACKS, 2017). Para isso, o sistema ósseo contribui para a homeostase mineral liberando Ca, P e Mg, e desempenhando papel essencial no equilíbrio ácido base (WILKENS *et al.*, 2020). Os osteoblastos, células ósseas, exercem papel fundamental na ativação do receptor NF $\kappa$ B, que por sua vez induz a diferenciação e maturação dos osteoclastos e promove o processo reabsorção óssea (BOYLE *et al.*, 2003).

O magnésio é um importante cátion intracelular, que atua principalmente como cofator enzimático para diversas vias metabólicas, modulação de canais, e formação óssea, além disso, este mineral é necessário para algumas funções vitais, tais como a condução dos impulsos nervosos, funções musculares e formação mineral óssea (GOFF, 2006). A vaca leiteira, com um peso corporal de 700 kg possui uma quantidade total de Mg de cerca de 450 a 500 g, a maioria do Mg é encontrada nos ossos (60% -70%), estando o restante alocado em espaços intracelulares. Em bovinos, a concentração fisiológica desse mineral varia entre 1,8 a 2,4mg/dL (KANEKO *et al.*, 2008), sendo que a manutenção das concentrações normais depende diretamente da ingestão de Mg na dieta. Dessa forma, a inapetência na vaca de leite pode desencadear um estado de hipomagnesemia, o que reflete na diminuição da resposta dos rins e dos ossos ao PTH (LEAN *et al.*, 2013). Casos de hipomagnesemia com efeitos negativos na calcemia tem sido reportado em alguns trabalhos (GOFF, 2004; LEAN *et al.*, 2013). Portanto, a concentração de Mg sanguíneo também apresenta importância em relação ao diagnóstico da hipocalcemia, podendo ocorrer hipomagnesemia associada à hipocalcemia no período de transição, de modo que o aumento da ingestão de magnésio ajuda a prevenir a hipocalcemia clínica (GOFF, 2008; SANTOS *et al.*, 2019).

O aumento de fósforo (P) no sangue é conhecido por estimular a produção e a secreção do fator de crescimento de fibroblastos por osteoblastos e osteócitos (LIU e QUARLES, 2007), e aumento do teor de P na dieta, aumenta a concentração sérica de P (PETERSON *et al.*, 2005). O papel do fator de crescimento de fibroblastos é regular o fosfato no sangue, mas também inibe a  $1\alpha$ -hidroxilase renal, suprimindo a síntese de 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> (LIU e QUARLES, 2007), o que pode afetar a homeostase do Ca.

Alguns fatores podem interferir na absorção do Ca como a concentração de diferentes minerais na dieta, o pH intestinal, a forma de administração e biodisponibilidade dos minerais, a quantidade de gordura e vitamina D da dieta e, com maior ênfase, a interferência de outros minerais, como o magnésio e o fósforo (GOFF, 2014).

## 2.2 HIPOCALCEMIA CLÍNICA X HIPOCALCEMIA SUBCLÍNICA

A hipocalcemia é uma condição metabólica comum durante o período de transição, caracterizada por uma concentração sérica de Ca total abaixo de 8,5 mg/dL (MARTINEZ *et al.*, 2012; OETZEL, 2013; RODRÍGUEZ *et al.*, 2017). Seja na sua forma clínica ou subclínica, a enfermidade, é apontada como causadora de grandes prejuízos na

atividade leiteira, sendo responsável por redução acentuada na produtividade total da lactação da vaca, e de forma indireta envolvendo complicações como a atonia ruminal, retenção de placenta, metrite, deslocamento de abomaso e cetose, reduzindo consideravelmente a vida produtiva do animal (CHAPINAL *et al.*, 2011; CHAMBERLIM *et al.*, 2013; GOFF, 2014; ALVARENGA *et al.*, 2015).

A concentração ideal de cálcio sérico em bovinos leiteiros deve ser mantido em torno de 8,5-10 mg/dL, o que caracteriza o animal como normocalcêmico. A partir do momento que o valor de cálcio sérico estiver abaixo de 8,5 mg/dL, a fêmea é classificada como hipocalcêmica na forma subclínica e abaixo de 5,5 mg/dL como hipocalcemia clínica (OETZEL, 2013; MARTINEZ, *et al.*, 2016). Vários pesquisadores adotam valores abaixo do limiar de 8,0 mg/dL para a normocalcemia (REINHARDT *et al.*, 2011; GOFF, 2014), no entanto, estudos mais recentes sugerem ponto de corte maior na delimitação de animais normocalcêmicos e hipocalcêmicos (MARTINEZ *et al.*, 2016; RODRÍGUEZ *et al.*, 2017; VALLDECABRES *et al.*, 2018).

A ocorrência da hipocalcemia clínica é relativamente rara, no entanto, quando apresentada na forma subclínica esses números podem chegar a mais de 50% de um rebanho (GOFF, 2008; LENO *et al.*, 2018; VALLDECABRES *et al.*, 2018), determinando sérios prejuízos para a saúde e a vida produtiva da vaca (OETZEL, 2013). Dados epidemiológicos sugerem que a incidência da enfermidade na forma subclínica pode chegar a 25% em animais de primeira cria e até 50% em vacas multíparas (REINHARDT *et al.*, 2011). Caixeta *et al.* (2015) em estudos recentes, observaram a incidência da hipocalcemia subclínica em vacas de primeira, segunda e terceira ou mais crias, nos valores de 17%, 55% e 73%, respectivamente. No Brasil, Carneiro (2018) observou em rebanhos paranaenses manejados em sistemas intensivos, uma prevalência de 78% de hipocalcemia subclínica.

A hipocalcemia apresenta formas distintas: a forma clínica, na qual os sinais clínicos são evidentes, e também, a forma subclínica, em que as vacas apresentam níveis baixos de cálcio sérico, no entanto, não demonstram sinais clínicos evidentes (McART, OETZEL, 2015). De acordo com Oetzel (2013), a hipocalcemia clínica, conhecida como “febre do leite”, é uma doença metabólica de curso agudo, que ocorre geralmente no momento do parto em fêmeas bovinas adultas, com a ascensão da nova lactação. Comumente, a doença é caracterizada em três fases (OETZEL, 2011). Na fase I, é possível evidenciar sinais sutis e transitórios de excitação e fraqueza, no entanto, sem decúbito esternal. A fase II caracteriza-se por fraqueza muscular moderada, paralisia parcial e tipicamente encontram-se em decúbito esternal e a cabeça virada em direção ao flanco. E na fase III os animais

acometidos desenvolvem flacidez esquelética e diminuição do tônus da musculatura lisa, paralisia acentuada, depressão grave da consciência, febre e decúbito lateral ou esternal, vindo a óbito em algumas horas, se não houver tratamento (OETZEL, 2013).

Fatores predisponentes para o desenvolvimento da hipocalcemia como a raça, idade e padrões nutricionais, já foram amplamente discutidos em trabalhos anteriores (GOFF, 2014; OETZEL, 2013). A idade do animal influencia, sobretudo, na sua capacidade em responder ao aumento da demanda de cálcio. Em vacas mais velhas, a desmineralização óssea, próximo ao parto, é mais reduzida do que nas novilhas. Isto porque os osteoblastos são o único tipo celular ósseo a expressar proteínas receptoras para 1,25-(OH)<sub>2</sub>D e, com o aumento da idade do animal, ocorre uma diminuição do número desse tipo de célula, diminuindo, assim, a habilidade do osso em contribuir para a manutenção da calcemia (HORST *et al.*, 1997).

Outro fator intrínseco do animal que influencia diretamente na incidência da hipocalcemia é o padrão racial. Entre as raças bovinas mais susceptíveis pela hipocalcemia está a Jersey, seguido da raça Guersey e Holandesa, isto devido a maior concentração de Ca no colostro e no leite. Alguns autores relacionam a maior incidência da hipocalcemia em vacas Jersey devido a diminuição do número de receptores para a 1,25-(OH)<sub>2</sub>D nos tecidos intestinais e à maior quantidade de Ca drenado no leite dessa raça quando comparado com animais da raça Holandesa (GOFF, 2014; GONZÁLEZ, SILVA, 2017).

Diante da intensa mobilização de Ca no periparto (para o feto, para a formação do colostro ou secreção de leite), somente é possível manter os níveis circulantes de Ca (70-80g/dia) por meio de uma maior eficiência na absorção intestinal e/ou pelo aumento da absorção óssea (GOFF, 2014), fato que contribui consideravelmente com a ocorrência da hipocalcemia. Fatores endócrinos relacionados ao animal e o manejo durante o período de transição são fatores importantes ligados a incidência da hipocalcemia subclínica no rebanho. O excesso de Ca na dieta, a deficiência de Mg no período seco, o excesso de proteína degradável e nitrogênio não-proteico (NNP) no pré-parto, a alta relação de carboidratos solúveis/carboidratos estruturais, o excesso de cátions fixos na dieta pré-parto (especialmente de Ca e K) e a insuficiência no ingresso de P e Mg no pós parto podem estar correlacionados diretamente com o desequilíbrio (GOFF, 2004).

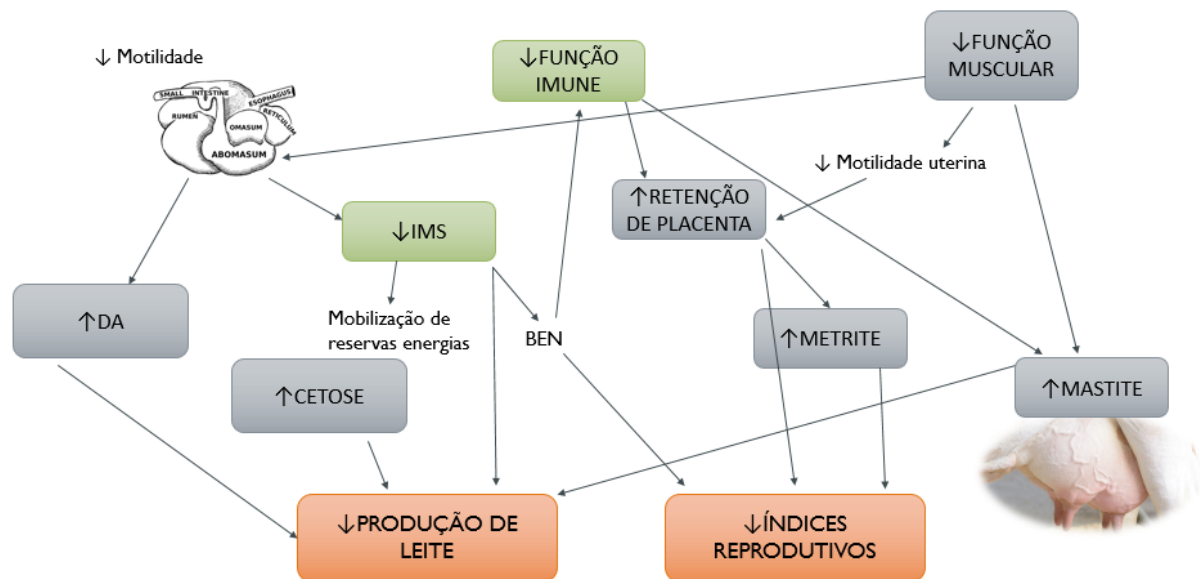
Além de prejuízos devido à alta mortalidade, a hipocalcemia pode causar outros agravos relacionados à redução da produção de leite, à perda de peso e à redução da vida útil do animal em três a quatro anos (VALLDECABRES *et al.*, 2018). As vacas que se recuperam desse distúrbio também têm maior propensão a outras enfermidades pós-parto,

como metrite, retenção de placenta, deslocamento de abomaso e acetonemia (JOYCE *et al.*, 1997, CHAPINAL *et al.*, 2011; MARTINEZ *et al.*, 2016).

### 2.3 HIPOCALCEMIA E DOENÇAS PUERPERAIS

Os transtornos metabólicos ocorrem com maior frequência no período de transição, que compreende três semanas pré e três semanas pós-parto, culminando com o momento mais delicado da vida do animal, devido às importantes alterações endócrinas, metabólicas e nutricionais que exigem uma alta capacidade de adaptação (CHAPINAL *et al.*, 2011, GOFF *et al.*, 2014). Nesse período há um aumento das necessidades energéticas e minerais concomitante à redução na ingestão de matéria seca (WEAVER *et al.*, 2016). Dentre as doenças que merecem destaque, a hipocalcemia, que predispõe a outras enfermidades metabólicas e infecciosas do periparto (FIGURA 3) (GOFF, 2014).

**Figura 3** – Cascata de eventos decorrentes da Hipocalcemia.



O cálcio possui funções fisiológicas sobre a mineralização óssea, a coagulação, os potenciais de ação cardíacos, a sinalização celular como um segundo mensageiro, e a contratilidade muscular e requer uma regulação rigorosa do Ca nos fluidos intracelulares e extracelulares (WILKENS *et al.*, 2020). Segundo Santos *et al.* (2019), as concentrações de Ca no sangue são determinantes para a eficiência na contratilidade do

músculo liso, para funções endócrinas e para ativação de respostas imunes inatas e adaptativas. As concentrações de cálcio diminuídas tem sido correlacionada com a redução da motilidade uterina, predispondo a acumulação de tecidos e secreções, e conseqüentemente, o desenvolvimento de infecções uterinas (ROBALO SILVA, NOAKES, 1984). Além disso, vacas hipocalcêmicas reduzem a ativação de linfócitos e de neutrófilos com atividade fagocítica, e também deprime a resposta celular mononuclear a um estímulo de antígenos (KIMURA *et al.*, 2006; MARTINEZ *et al.*, 2012, 2014).

Pesquisas anteriores relatam que há uma forte correlação da hipocalcemia subclínica e o desenvolvimento de outras enfermidades, como a retenção de placenta, deslocamento do abomaso à esquerda, mastite, metrite e cetose (GOFF, 2008; JAWOR *et al.*, 2012; MARTINEZ *et al.*, 2012; RODRÍGUEZ *et al.*, 2016). Devido ao fato de baixas concentrações séricas de Ca afetarem negativamente vacas leiteiras no periparto, Martinez e colaboradores (2012) realizaram um estudo para evidenciar o risco de doenças em fêmeas bovinas relacionada com a hipocalcemia no pós-parto e observaram um risco maior no desenvolvimento de metrite em animais hipocalcêmicos (Ca <8,6mg/dL). Em outras pesquisas, foi evidenciado que a hipocalcemia aumentou as concentrações de ácidos graxos no plasma, comprometeu o sistema imunológico, a produtividade e o desempenho reprodutivo dos animais afetados (CHAPINAL *et al.*, 2012; MARTINEZ *et al.*, 2014). De fato, vacas hipocalcêmicas tendem a mobilizar gordura corporal no pós-parto, resultando em maiores concentrações sanguíneas de NEFA e aumentando o risco do desenvolvimento de acetonemia e deslocamento de abomaso (GOFF, 2014).

#### 2.4 ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO DA HIPOCALCEMIA

Para minimizar o risco da ocorrência da hipocalcemia em vacas leiteiras, diferentes estratégias e protocolos de tratamento tem sido proposto nos últimos anos. Alguns métodos relativamente simples incluem o monitoramento de Ca, Mg e K nas dietas pré-parto, a incorporação de sais aniônicos à dieta, a suplementação de fontes de vitamina D e, mais recentemente, a suplementação de cálcio via oral praticadas combinadas ou isoladamente (OETZEL, 2013; GOFF *et al.*, 2014; FARNIA *et al.*, 2018). Outras medidas de prevenção da hipocalcemia são utilizadas, mas não são específicas, como o controle da condição corporal, o controle da ingestão de hidratos de carbono no periparto e a redução da ordenha no início da lactação (THILSING-HANSEN *et al.*, 2002).

#### 2.4.1 Monitoramento de minerais nas dietas

O periparto (3 semanas que antecede o parto até 3 semanas após o parto) é um período de grande desafio para o animal, pois as alterações metabólicas acabam desencadeando situações que levam a uma queda na ingestão de matéria seca pela vaca, e, conseqüentemente, o aporte de alimentos com ótima qualidade é necessário para que se supra todas as necessidades nutricionais nessa fase.

A alimentação pode influenciar na susceptibilidade dos animais à hipocalcemia, especialmente quando alimentados no período pré e pós-parto em grande quantidade, principalmente com alimentos com altos níveis de proteína ou de carboidratos fermentáveis, ou com quantidades exacerbadas ou insuficientes de minerais como o Ca, Mg e K (GOFF, 2004).

De maneira geral, é importante a análise dos níveis de minerais nos ingredientes da dieta, que podem favorecer a ocorrência de distúrbios metabólicos, principalmente o cálcio e potássio que se encontram em maior quantidade em forragens e co-produtos utilizados nas dietas brasileiras. Goff e Horst (1997) relataram que a ingestão de grande quantidade de cálcio no pré-parto deve ser restrita, pois em consequência, resultará na diminuição dos mecanismos de mobilização e absorção do Ca. Lean e colaboradores (2006) verificaram a relação da concentração de cálcio na dieta e a incidência de hipocalcemia, ao aumentar de 0,5 a 0,6% a concentração de cálcio na dieta, estima-se aumentar em 37% o risco de hipocalcemia.

As vacas secas alimentadas basicamente com feno ou silagem de milho, tem menor incidência de hipocalcemia na parição, por serem alimentos que possuem menores níveis de cálcio. Entretanto, se forem incluídos alimentos com altos níveis de cálcio como a alfafa, os índices de hipocalcemia se elevam (GOFF, 2004).

Os níveis de Mg na dieta e, conseqüentemente, nos níveis séricos circulantes exercem influência na homeostase do cálcio por reduzir a secreção de PTH e por reduzir a responsividade do tecido ao PTH. Sua influência é independente da acidose metabólica, então baixos valores séricos de magnésio comprometem a absorção do cálcio (LEAN *et al.*, 2013). Estudos comprovam que concentrações plasmáticas de Mg inferiores a 0,65 mmol/L (1,5 mg/dL) no periparto de vacas, podem aumentar a susceptibilidade à hipocalcemia (GOFF, 2006).

As concentrações de K na dieta são influenciadas pela disponibilidade do potássio no solo, a espécie de planta, maturidade e como as culturas forrageiras são

conduzidas, pensando principalmente em adubações. No Brasil em especial, a quantidade de K na dieta está relacionada com o teor do mineral no solo e com as constantes adubações nas forrageiras utilizadas na alimentação animal. Em estudo recente, Santos *et al.* (2019) relatou a uma possível dependência dietética de K em relação ao Mg na redução da hipocalcemia, sendo que a sua insuficiência pode acarretar no desenvolvimento do desequilíbrio.

Para diminuir a ocorrência e prevenir esses distúrbios metabólicos é necessário monitorar as concentrações de cálcio, magnésio e fósforo, bem como a diferença cátion- aniônica da dieta pré-parto, principalmente nos 21 dias que antecedem ao parto (LEAN *et al.*, 2013). A monitoração dos minerais na dieta pode ser realizada por meio da mensuração do pH da urina, o que pode ser facilmente executado durante o pré-parto em vacas que estão ingerindo a dieta há pelo menos 5 dias até 3 semanas (GOFF, 2008).

#### 2.4.2 Dietas aniônicas e o balanço entre cátions e ânions da dieta (BCAD)

Como estratégia preventiva, os sais aniônicos têm sido utilizados a fim de auxiliar na homeostase do cálcio e na redução dos distúrbios metabólicos no pós-parto. A adição de ânions, como cloro (Cl) e enxofre (S) à dieta pré-parto, induz na vaca uma acidose metabólica que auxilia na reabsorção óssea e na absorção intestinal de cálcio e, conseqüentemente, minimiza a incidência da hipocalcemia no pós-parto (WILKENS *et al.*, 2012a; GOFF, 2014). Alguns autores preconizam essa utilização nos 21 dias que antecedem o parto, também conhecido como período de transição, enquanto a exposição por longos períodos pode levar a um efeito contrário, aumentando o risco de hipocalcemia em 42% (LEAN *et al.*, 2006).

A teoria da diferença entre cátions e ânions da dieta na prevenção da hipocalcemia tem sua base no modelo iônico dos ácidos fortes com resultado no saldo das bases. Esse modelo foi modificado nos anos 80 e simplificado em 1990 (CONSTABLE, 1999). Em termos nutricionais, os cátions mais importantes são o sódio (Na), o potássio (K), o cálcio (Ca) e o magnésio (Mg), enquanto o cloreto (Cl<sup>-</sup>), o enxofre (S) e fósforo (P) representam os mais relevantes ânions de uma dieta.

A prevenção da febre do leite, em partes, envolve a aplicação da diferença cátion-aniônica da dieta (DCAD) para reduzir a diferença de íons fortes, conhecido como *Strong Ions Difference* ([SID<sup>+</sup>]), diminuindo o pH da urina e do sangue, e provocando uma leve acidose metabólica desejada. Assim pode-se calcular o DCAD da dieta com base na equação  $DCAD = [(Na^+ + K^+) - (Cl^- + S^{-2})]$  (LEAN *et al.*, 2003). Para que haja a supressão da

hipocalcemia e sejam mantidos os níveis de Ca circulantes, muitos estudos apontam que os valores para a DCAD devem ficar em torno de -50 a -150mEq/kg (OETZEL, 2000; LENO *et al.*, 2018). No entanto, quanto menor o valor relacionado a dieta aniônica mais prejudicado fica o alimento em termos de palatabilidade, diminuindo a ingestão de matéria seca e desencadeando problemas secundários, como a cetose (MOORE *et al.*, 2000).

Especialmente no Brasil, a formulação de dietas levando em consideração a remoção de cátions da alimentação do rebanho é extremamente dificultada, devido a utilização em grande escala de elementos como o fósforo e o potássio na adubação das forrageiras (BERNARDI *et al.*, 2002). Outra forma de manipular a dieta para que alcance DCAD negativa é a inclusão de sais aniônicos na forma de ração total misturada (RTM) como o cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ), sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) e sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) (GOFF *et al.*, 2004; WILKENS *et al.* 2012a).

O principal efeito de uma DCAD negativa é modular o balanço ácido base sistêmico da vaca, através da manutenção da neutralidade elétrica do organismo. Assim, através da administração de ânions, como os cloretos e os sulfatos, mediante o uso dos chamados “sais aniônicos”, aumenta a concentração sistêmica do íon hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) (CORBELLINI, 1998). Em suma, a dieta aniônica no pré-parto tem como finalidade provocar uma acidose metabólica moderada e reduzir a intensidade e duração da hipocalcemia (GOFF, 2006). A perda contínua de cálcio pela urina nas últimas semanas de gestação ativa os mecanismos envolvidos na manutenção da calcemia, mediados pelo PTH e pelo calcitriol. No entanto, com a interrupção do fornecimento de dietas aniônicas logo após parto, a acidose metabólica é revertida com a diminuição da excreção de Ca, contribuindo na elevação da concentração de Ca sérico no periparto (FARNIA *et al.*, 2018; WILKENS *et al.*, 2020).

Para o controle da eficácia da dieta aniônica é analisado o pH urinário e preconiza-se que este permaneça entre 6,2 e 6,8; abaixo desses valores pode causar prejuízos ao animal por reduzir mais o pH sanguíneo, provocando um quadro de acidose metabólica grave (MULLIGAN *et al.*, 2008) e valores aumentados pode ser indicativo de erros nas formulações, bem como da falta de responsividade a dieta. Entretanto, o fornecimento de dietas aniônicas no pré-parto pode afetar indiretamente a ingestão de matéria-seca e a produção de leite.

Em geral, os sais aniônicos apresentam problemas relacionados a palatabilidade quando fornecidos sob a forma de dietas totais, sendo necessário mascarar o sabor dos mesmos e assim, não deprimindo o consumo de matéria seca. Entre as formulações,

o cloreto de cálcio é o menos palatável, enquanto o cloreto de magnésio é mais palatável (GONZÁLEZ, SILVA, 2017).

#### 2.4.3 Suplementação de Vitamina D no pré-parto

A suplementação oral de Vitamina D na sua forma ativa pode ser considerada uma estratégia profilática, tendo como objetivo aumentar a absorção intestinal de cálcio no periparto. Por muitos anos os estudos se concentraram nessa forma de tratamento, descobrindo por ocasião o calcidiol (25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>) e mais tarde comprovando-se a 1,25-dihidroxivitamina (calcitriol) como forma ativa da vitamina D (HORST *et al.*, 1997).

A vitamina D pode ser incluída na alimentação animal na forma vegetal, o ergocalciferol (D<sub>2</sub>), ou na forma animal, colecalciferol (D<sub>3</sub>), ou ainda via síntese do 7-desidro-colesterol pela epiderme (DUKES, REECE, 2006). Segundo Radostitis e colaboradores (2002) e NRC (2001), o fornecimento deve prever a inclusão de doses maciças (até 1 milhão de UI) e iniciar nos últimos dias que antecedem o parto, atenuando assim os casos de hipocalcemia. Entretanto, deve ser evitado a suplementação prolongada de vitamina D devido a probabilidade de intoxicação aos animais e calcificação irreversível de tecidos moles, em contrapartida, o fornecimento de baixas doses pode interferir na produção de 1,25-dihidroxi-colecalciferol durante o período hipocalcêmico pós-parto.

Embora a hipocalcemia não tenha sido evitada completamente em estudo avaliando o efeito da suplementação da dieta aniônica combinada com 25-hidroxivitamina D no pré-parto, os pesquisadores observaram efeitos positivos em relação a ingestão de matéria seca e na concentração sérica de Ca quando administrado o tratamento com DCAD negativa e 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> simultaneamente (WILKENS *et al.*, 2012a). Em contrapartida, em pesquisas recentes a suplementação de vitamina D para vacas leiteiras acima de 60.000 UI/d sugerem poucos benefícios sobre a homeostase do Ca, uma vez que as vacas parecem ter uma capacidade limitada na conversão de Vitamina D<sub>3</sub> em 25(OH)D<sub>3</sub> (POINDEXTER *et al.*, 2020).

A suplementação na dieta com 20 a 30.000UI/dia de Vitamina D é uma prática rotineira de muitas fazendas leiteiras com o intuito de prevenir os casos de hipocalcemia (GOFF, 2004). A maior desvantagem desta estratégia é a dificuldade de prever a data do parto, uma vez que a vitamina D é mais efetiva entre um e quatro dias antes e também doses repetidas podem ser tóxicas (GOFF *et al.*, 2014).

#### 2.4.4 Suplementação de cálcio oral como medida preventiva

Como estratégia preventiva de tratamento, pesquisadores tem trabalhado com o cálcio administrado oralmente no periparto (PINEDO *et al.*, 2016; FARNIA *et al.*, 2018; WILMS *et al.*, 2019). Este transporte passivo que ocorre de um meio de maior concentração para um de menor concentração só ocorre com doses elevadas de cálcio via oral, entre 50 e 125g de Ca/dose (OETZEL, 2013). As principais fontes desses suplementos são relativamente solúveis e com rápida absorção intestinal, sendo as mais estudadas até o momento o cloreto de cálcio, propionato de cálcio, fosfato tricálcico e, mais recentemente, o formiato de cálcio (OETZEL; MILLER, 2012; MARTINEZ *et al.* 2016; VALLDECABRES *et al.*, 2018; CARNEIRO, 2018).

De acordo com Goff e Horst (1993), as soluções via oral de Ca devem preferencialmente disponibilizar o cálcio no forma livre, devido a facilidade de absorção pelo rúmen e abomaso. Os ruminantes de forma geral, absorvem o cálcio por dois mecanismos distintos: pelo transporte ativo e pelo transporte passivo entre as células epiteliais intestinais. O processo de transporte ativo está intimamente ligado a ação hormonal, com o PTH sendo secretado pelas glândulas paratireoides e a ação da 1,25-dihidroxitamina D, produzida então pelos rins (HORST *et al.*, 1993). Já o transporte passivo do cálcio depende do gradiente de concentração e da difusão passiva de cálcio do lúmen do intestino para os fluidos extracelulares (MARTÍN-TERESO, MARTENS, 2014). O aumento na concentração luminal de cálcio acima de 1mM com a utilização da suplementação de cálcio, favorece um incremento do transporte passivo de cálcio para fluidos extracelulares (GOFF, HORST, 1993). O princípio da utilização de cálcio oral se dá principalmente pela sua biodisponibilidade e sua capacidade de modular uma resposta acidogênica em vacas leiteiras (OETZEL, 2013; GOFF, 2014).

Sampson e colaboradores (2009) estudando a utilização da combinação de cloreto de cálcio e sulfato de cálcio obtiveram resultado satisfatório na resposta calcêmica em vacas leiteiras no pós-parto. Leno *et al.* (2018) observaram em seus estudos a efetividade do cálcio oral na prevenção de doenças nos animais no pós-parto. E mais recentemente, Carneiro (2018) observou um incremento modesto nas concentrações de cálcio total no sangue em 30 minutos após a administração oral de formiato de cálcio, retornando ao limiar basal em 8 horas.

Com base em estudos anteriores, existem diferentes protocolos preventivos de administração oral de cálcio baseados na curva da calcemia desenvolvida por Kimura *et al.*

(2006), os quais preconizam a utilização de até 4 doses que equivalem 12 horas antecedentes ao parto, ao parto, 12 e 24 horas após o parto. A dificuldade desses protocolos é a administração nas 12 horas que antecedem ao parto, devido principalmente as condições fisiológicas individuais de cada animal e na variação que pode ocorrer por diferentes motivos, como ambiental ou ainda pela interferência humana. Pesquisa recente realizada por Carneiro (2018), preconizou a utilização de protocolo com administração de formiato de cálcio no dia do parto e 24 horas após a primeira dose.

A utilização do cálcio oral na formulação com formiato de cálcio pode ser uma alternativa estratégica do ponto de vista produtivo, assegurando a produtividade do rebanho e garantindo os níveis de cálcio no momento do parto, evitando assim perdas econômicas relacionadas às doenças metabólicas. De acordo com EFSA (2015), a fonte de formiato de cálcio disponível no mercado é uma derivação do ácido fórmico com aproximadamente 36,5% de cálcio provenientes da cal hidratada. Para que resulte em formiato de cálcio é necessário a utilização do tratamento térmico, para retirar o formaldeído de sua composição, além de inibir a irritação e corrosão de mucosas gastrointestinais comumente encontrados em outros tipos de formulação com cálcio oral, como o cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) (GOFF *et al.*, 1996; OETZEL, 2013).

Relatos recentes de Carneiro (2018) e Mcart e Oetzel (2015) discorrem efeitos positivos relacionados a produção em vacas de leite suplementadas na forma oral com fontes de cálcio. Apesar dos trabalhos demonstrarem tais efeitos, atualmente os produtos orais de suplementação de cálcio comercializados no país encontram-se formulados com base no formiato de cálcio, apresentando poucas pesquisas com a formulação e seus efeitos proporcionados. Portanto, devido a importância da hipocalcemia em rebanhos leiteiros e das estratégias profiláticas para diminuição da incidência da doença, é fundamental que estudos sejam realizados para verificar a eficiência da suplementação oral de cálcio e dietas acidogênicas sob a calcemia no pós-parto, evitando assim prejuízos na pecuária leiteira.

### 3 REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, E.A., MOREIRA, G.H.F.A, FILHO, E.J.F., LEME, F.O.P., COELHO S.G., MOLINA, L.R., LIMA, J., CARVALHO, A.U. Avaliação do perfil metabólico de vacas da raça Holandesa durante o período de transição. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.35, n.3, p.281-290, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2015000300012>.
- BERNARDI, A.C.C.; MACHADO, P.O.A., SILVA, C.A. Fertilidade do solo e demanda por nutrientes no Brasil. In: MANZATTO, C.M.; FREITAS JÚNIOR, E.; PERES, J.R.R. **Uso agrícola dos solos brasileiros**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos. 2002. p.61-77.
- BLANC, C.D., VAN DER LIST, M., ALY, S.S., ROSSOW, H.A., SILVA-DEL-RÍO, N. Blood calcium dynamics after prophylactic treatment of subclinical hypocalcemia with oral or intravenous calcium. **Journal of Dairy Science**. v.97, p.6901–6906, 2014. Disponível em: <http://doi:10.3168/jds.2014-7927>.
- BOUILLON, R.; VAN CROMPHAUT, S.; CARMELIET, G. Intestinal calcium absorption: molecular vitamin D mediated mechanisms. **Journal of Cellular Biochemistry**. v.88, n.2, p.332–339, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcb.10360>.
- BOYLE, W.J., SIMONET, W.S., LACEY, D.L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**. v.423, p.337–342, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature01658>.
- BRONNER, F. Mechanisms of intestinal calcium absorption. **Journal of Cellular Biochemistry**. v.88, n.2, p.387–393, 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.10330>.
- CAIXETA, L.S., OSPINA, L.A., CAPEL, M.B., NYDAM, D.V. The association of subclinical hypocalcemia, negative energy balance and disease with bodyweight change during the first 30 days post-partum in dairy cows milked with automatic milking systems. **The Veterinary Journal**. v.204, n.2, p.150-156, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.01.021>.
- CARNEIRO, E. W. Efeito do uso de formiato de cálcio via oral no pós-parto imediato sobre a hipocalcemia em vacas leiteiras. 2018. 134p. Tese (Doutorado) –Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, 2018.
- CASE, R.M.; EISNER, D.; GURNEY, A., JONES, O., MUALLEM, S., VERKHRATSKY, A. Evolution of calcium homeostasis: from birth of the first cell to an omnipresent signalling system. **Cell Calcium**. v.42, n.4–5, p.345–350, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2007.05.001>.
- CHAMBERLIN, W.G., MIDDLETON, J.R., SPAIN, J.N., JOHNSON, G.C., ELLERSIECK, M.R., PITHUA, P. Subclinical hypocalcemia, plasma biochemical parameters, lipid metabolism, postpartum disease, and fertility in postparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.96, n.11, p.7001–7013. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6901>.

CHAPINAL, N., CARSON, M., DUFFIELD, T.F., CAPEL, M., GODDEN, S., OVERTON, M., SANTOS, J.E.P., LEBLANC, S. J. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. **Journal of Dairy Science**. v.94, n.10, p.4897–4903. 2011. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-4075>.

CONSTABLE, P.D. Clinical assessment of acid-base status: Strong ion difference theory. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**. v.15, p.447–471, 1999. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30158-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30158-4).

CORBELLINI, C. N. Etiopatogenia e controle da hipocalcemia e hipomagnesemia em vacas leiteiras. In: Gonzalez, F.H.D. et al. (eds.) Anais do Seminário Internacional sobre Deficiências Minerais em Ruminantes. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998. 28p.

DUKES, H. H.; REECE, W. O. **Fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2006.

EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed). Scientific Opinion on the safety and efficacy of ammonium formate, calcium formate and sodium formate when used as a technological additive for all animal species. **EFSA Journal**. v.13, n.5, 4056, 2015.

FARNIA, S. A., RASOOLI, A., NOURI, M., SHAHRYARIC, A., BAKHTIARYD, M.K., CONSTABLE, P.D. Effect of postparturient oral calcium administration on serum total calcium concentration in Holstein cows fed diets of different dietary cation-anion difference in late gestation. **Research in Veterinary Science**. v.117, n., p.118–124. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.11.017>.

GOFF, J.P. Macromineral disorders of the transition cow. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**. v.20, p.471–494, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2004.06.003>.

GOFF, J.P. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. **Veterinary Journal**. v.176, p.50–57, 2008. Disponível em: <http://doi: 10.1016/j.tvjl.2007.12.020>.

GOFF, J.P. Calcium and magnesium disorders. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**. v.30, p.359-381, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.04.003>.

GOFF, J.P. 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**. v.126, p.237–257, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.08.005>

GOFF, J.P., HORST., R.L. Oral administration of calcium salts for treatment of hypocalcemia in cattle. **Journal of Dairy Science**. v.76, p.101–108, 1993. Disponível em: [http://doi:10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77328-2](http://doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77328-2).

GOFF, J.P., HORST, R.L., JARDON, P.W., BORELLI, C., WEDAM, J. Field trials of

an oral calcium propionate paste as an aid to prevent milk fever in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.79, p.378–383, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76375-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76375-0).

GOFF, J.P., HORST, R.L. Effects of the addition of potassium or sodium, but not calcium, to prepartum rations on milk fever in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.80, p.176-186, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(97\)75925-3](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(97)75925-3).

GOFF, J.P., RUIZ, R., HORST, R.L. Relative acidifying activity of anionic salts commonly used to prevent milk fever. **Journal of Dairy Science**. v.87, n.5, p.1245-55, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73275-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73275-0).

GOFF, J.P., LIESENGANG, A., HORST, R.L. Diet-induced pseudohypoparathyroidism: A hypocalcemia and milk fever risk factor. **Journal of Dairy Science**. v.97, p.1520–1528. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7467>.

GONZÁLEZ, F.H.D., SILVA, S.C., **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. 3ª Ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2017.

HENRY, J.B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 18ª Ed. Brasil: Editora Manole LTDA, 1678p. 1995.

HORST, R.L., GOFF, J.P., REINHARDT, T.A., BUXTON, D.R. Strategies for Preventing Milk Fever in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**. v.80, n.7, p.1269-1280, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76056-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76056-9)

HORST, R. L., GOFF, J. P., REINHARDT, A. Calcium and Vitamin D Metabolism in the Dairy Cow. **Journal of Dairy Science**. v.77, p.1936-1951. 1993. Disponível em: [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77140-X](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77140-X)

HORST, R. Regulation of calcium and phosphorus homeostasis in the dairy cow. **Journal of Dairy Science**. v.69, n.2, p.604–616, 1986. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80445-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(86)80445-3)

JAWOR, P.E., HUZZEY, J.M., LEBLANC, S.J., VON KEYSERLINGK, M.A.G. Associations of subclinical hypocalcemia at calving with milk yield, and feeding, drinking, and standing behaviors around parturition in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**. v.95, n.3, p.1240–1248, 2012. Disponível em: <https://doi.org/2012.10.3168/jds.2011-4586>

JONES, T.C., HUNT, R.D., KING, N.W. **Patologia veterinária**. 6 ed. São Paulo: Manole. p. 813-815. 2000.

JOYCE, P.W., SANCHEZ, W.K., GOFF, J.P. Effect of anionic salt in prepartum diets based on alfafa. **Journal of Dairy Science**. v.80, n.11, p.2866-2875, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76251-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76251-9)

KANEKO J.J., HARVEY, J.W., BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th ed. Academic Press, London. 932p. 2008.

- KIMURA, K., REINHARDT, T.A., GOFF, J.P. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. v.89, n. 7, p.2588–2595, 2006. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72335-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72335-9)
- KHANAL, R., NEMERE, I. Regulation of intestinal calcium transport. **Annual Review of Nutrition**. v.28, 179–196. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.010308.161202>
- KOVACS, C. S. The skeleton is a storehouse of mineral that is plundered during lactation and (fully?) replenished afterwards. **Journal of Bone and Mineral Research**. v.32, p.676–680. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jbmr.3090>.
- LEAN, I.J., SAUN, R.V., DEGARIS, P.J. Mineral and Antioxidant Management of Transition Dairy Cows. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**. v.29, p.367-386, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.03.004>
- LEAN, I.J.; DEGARIS, P.J.; WADE, L.K.; RAJCZYK, Z.K. Transition management of dairy cows. *In*: PARKINSON, T.J., (org.). **Proceedings of the Australian and New Zealand Combined Dairy Cattle Veterinarians Conference** - incorporating the 20th Annual Seminar of the Society of Dairy Cattle Veterinarians of the New Zealand Veterinary Association. New Zealand, Veterinary Association, 2003.
- LEAN, I.J., DeGARIS, P.J., McNEIL, D.M., BLOCK, E. Hypocalcemia in Dairy Cows: Meta-analysis and Dietary Cation Anion Difference Theory Revisited. **Journal of Dairy Science**. v.89, p.669-684, 2006. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72130-0](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72130-0).
- LEBLANC, S.J., LISSEMORE, K.D., KELTON, D.F., DUFFIELD, T.F., LESLIE, K.E. Major Advances in Disease Prevention in Dairy Cattle **Journal of Dairy Science**. v.89, p.1267–1279, 2006. Disponível em: [http://doi:10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72195-6](http://doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72195-6).
- LENO, B.M., NEVES, R.C., LOUGE, I.M., CURLER, M.D., THOMAS, M.J., OVERTON, T.R., MCART, J.A.A. Differential effects of a single dose of oral calcium based on postpartum plasma calcium concentration in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**. v.101, p.3285–3302, 2018. Disponível em: <http://doi:10.3168/jds.2017-13164>.
- LIU, S., QUARLES, L.D. How fibroblast growth factor 23 works. **J. Am. Soc. Nephrol**. v.18, n.6, p.1637–1647, 2007. Disponível em: <http://doi:10.1681/ASN.2007010068>
- LUCA, H.F.; MELANCON, M.J. **25-Hydrocholecalciferol: a hormonal form of vitamin D in biochemical actions of hormones**. New York: Academic Press, p.337-379. 1972.
- MARTINEZ, N., RISCO, C.A., LIMA, F.S., BISINOTTO, R.S., GRECO, L.F., RIBEIRO, E.S., MAUNSELL, F. GALVÃO, K., SANTOS, J.E.P. 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**. v.95, n.12, p.7158–7172, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5812>.
- MARTINEZ, N., SINEDINO, L.D.P., BISINOTTO, R.S., RIBEIRO, E.S., GOMES, G.C., LIMA, F.S., GRECO, L.F., RISCO, C.A., GALVÃO, K.N., TAYLOR-RODRIGUEZ, D., DRIVER, J.P., THATCHER, W.W., SANTOS, J.E.P. Effect of induced subclinical

hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.97, n.2, p.874–887, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7408>.

MARTINEZ, N., SINEDINO, L.D.P., BISINOTTO, R.S., DAETZ, R., RISCO, C.A., GALVÃO, K.N., THATCHER, W.W., SANTOS, J.E.P. Effects of oral calcium supplementation on productive and reproductive performance in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**. v.99, p.8417–8430. 2016. Disponível em: <http://doi:10.3168/jds.2015-10529>.

MARTÍN-TERESO, J., VERSTEGEN, M.W. A novel model to explain dietary factors affecting hypocalcaemia in dairy cattle. **Nutrition Research Reviews**. v.24, n.2, p.228–43, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1017/S0954422411000126>.

MARTÍN-TERESO, J.; MARTENS, H. Calcium and Magnesium Physiology and Nutrition in Relation to the Prevention of Milk Fever and Tetany (Dietary Management of Macrominerals in Preventing Disease). **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**. v.30, p.643-670, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.07.007>.

McART, J.A.A., OETZEL, G.R. A stochastic estimate of the economic impact of oral calcium supplementation in postparturient dairy cow. **Journal of Dairy Science**. v.98, n.10, p.7408–7418, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9479>.

MOORE, S.J., VANDEHAAR, M.J., SHARMA, B.K., PILBEAM, T.E., BEEDE, D.K., BUCHOLTZ, H.F., LIESMAN, J.S., HORST, R.L., GOFF, J.P. Effects of altering dietary cation-anion difference on calcium and energy metabolism in peripartum cows. **Journal of Dairy Science**. v.83, n.9, p.2095-2104, 2000. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75091-0](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75091-0).

MULLIGAN, F.J., O'GRADY, L., DOHERTY, M.L. Milk fever and subclinical hypocalcemia: their role in transition cow health and prevention strategies. **British Cattle Veterinary Association**. v.16, n.3, p.188-193, 2008.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington, DC: National Academy Press, 2001. 260p.

OETZEL, G.R. Oral Calcium supplementation in Peripartum Dairy Cows. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**. v.29, p.447–455. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.03.006>.

OETZEL, G. R. **Non-infectious diseases: Milk fever**. Pages 239–245 in Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol 2. J. W. Fuquay and P. L. McSweeney, ed. Academic Press, San Diego, CA. 2011.

OETZEL, G.R., MILLER, B.E. Effect of oral calcium bolus supplementation on early-lactation health and milk yield in commercial dairy herds. **Journal of Dairy Science**. v.95, n.12, p.7051–7065, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5510>.

OETZEL, G.R. Management of dry cows for the prevention of milk fever and other mineral disorders. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**. v.16, n.2, p.369-386, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30110-9](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30110-9).

PÉREZ, A., PICOTTO, G., CARPENTIERI, A., RIVOIRA, M.A., PERALTA LÓPEZ, M.E., TOLOSA DE TALAMONI, N.G. Minireview on regulation of intestinal calcium absorption. Emphasis on molecular mechanisms of transcellular pathway. **Digestion**. v.77, n.1, p.22–34, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000116623>.

PETERSON, A.B., ORTH, M.W., GOFF, J.P., BEEDE, D.K. Periparturient responses of multiparous Holstein cows fed different dietary phosphorus concentrations prepartum. **Journal of Dairy Science**. v.88, p.3582–3594, 2005. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73043-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73043-5)

PINEDO, P., VELEZ, J., SOLANO, G., RODRIGUEZ, N., NAVES, J., SCHUENEMANN, G. M., RISCO, C. Effect of oral calcium administration on the cure and reproductive performance of Holstein cows diagnosed with puerperal metritis. **Journal of Dairy Science**. v.100, n.4, p.2917–2927, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11577>.

POINDEXTER, M.B., KWEH, M.F., ZIMPEL, R., ZUNIGA, J., LOPERA, C., ZENOBI, M., JIANG, Y., ENGSTROM, M., CELI, P., SANTOS, J.E.P., NELSON, C.D. Feeding 25-hydroxyvitamin D3 increases sérum mineral concentrations and alters mammary immunity of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.103, p.805–822, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16999>.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**, 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

REINHARDT, T.A., LIPPOLIS, J.D., MCCLUSKEY, B.J., GOFF, J.P., HORST R.L. The Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. **Veterinary Journal**. v.188, n.1, p.122- 124, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.025>.

ROBALO SILVA, J., NOAKES, D.E. The effect of experimentally induced hypocalcaemia on uterine activity at parturition in the ewe. **Theriogenology**. v.21, p.607–623, 1984. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(84\)90446-1](https://doi.org/10.1016/0093-691x(84)90446-1).

RODRÍGUEZ, E. M., ARÍS, A., BACH, A. Associations between subclinical hypocalcemia and postparturient diseases in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.100, p.7427–7434, 2017. Disponível em: <http://doi.org/10.3168/jds.2016-12210>.

RUDE, R. K. Magnesium deficiency: a cause of heterogeneous disease in humans. **The Journal of Bone and Mineral Research**. v.13, n.4, p.749-758, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.4.749>.

SAMPSON, J.D., SPAIN, J.N., JONES, C., CARSTENSEN, L. Effects of calcium chloride and calcium sulfate in an oral bolus given as a supplement to postpartum dairy cows. **Veterinary Therapeutics**. v.10, n.3, p.131–139, 2009. Disponível em: PMID: 20037967.

SANTOS, J.E.P. LEAN, I.J., GOLDBER, H., BLOCK, E. Meta-analysis of the effects of prepartum dietary cation-anion difference on performance and health of dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.102, n.3, p. 2134–2154, 2019. Disponível em: <http://doi.org/10.3168/jds.2018-14628>.

SANTOS, J.E.P., R.S. BISINOTTO, E.S. RIBEIRO, F.S. LIMA, L.F. GRECO, C. R. STAPLES, AND W. W. THATCHER. Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. **The Society for Reproduction and Fertility**. v.67, p.387–403, 2010. Disponível em: <http://doi:10.7313/upo9781907284991.030>.

THE BAULT, S., HOENDEROP, J.G., BINDELS, R.J. Epithelial Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> channels in kidney disease. **Advances in Chronic Kidney Disease**. v.13, n.2, p.110–117, 2006. Disponível em: <http://doi:10.1053/j.ackd.2006.01.002>.

THILSING-HANSEN, T., JORGENSEN, R. J., OSTERGAARD, S. Milk fever control principles: a review. **Acta veterinaria Scandinavica**, v.43, n.1, p.1-19, 2002. Disponível em: <http://doi:10.1186/1751-0147-43-1>.

VALLDECABRES, A., PIRES, J.A.A., SILVA-DEL-RÍO, N. Effect of prophylactic oral calcium supplementation on postpartum mineral status and markers of energy balance of multiparous Jersey cows. **Journal of Dairy Science**. v.101, n.5, p.4460–4472, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12917>.

VAN ABEL, M., HOENDEROP, J.G., VAN DER KEMP, A.W., FRIEDLAENDER, M.M., VAN LEEUWEN, J.P., BINDELS, R.J. Coordinated control of renal Ca<sup>2+</sup> transport proteins by parathyroid hormone. **Kidney International**. v.68, n.4, p.1708–1721, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00587.x>.

WEAVER, S. R., LAPORTA, J., MOORE, S. A., HERNANDEZ, L.L. Serotonin and calcium homeostasis during the transition period. **Domestic Animal Endocrinology**. v.56, p.S147–S154, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.11.004>.

WILKENS, M.R., OBERHEIDE, I., SCHRÖDER, B., AZEM, E., STEINBERG, W., BREVES, G. Influence of the combination of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and a diet negative in cation-anion difference on peripartal calcium homeostasis of dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.95, n.1, p.151-164, 2012a. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4342>.

WILKENS, M.R., RICHTER, J., FRASER, D.R., LIESEGANG, A., BREVES, G., SCHRÖDER, B. In contrast to sheep, goats adapt to dietary calcium restriction by increasing intestinal absorption of calcium. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**. v.163, p.396–406, 2012b. Disponível em: <https://doi:10.1016/j.cbpa.2012.06.01>.

WILKENS, M.R., NELSON, C.D., HERNANDEZ, L.L., MCART, J.A.A. Symposium review: Transition cow calcium homeostasis - Health effects of hypocalcemia and strategies for prevention\*. **Journal of Dairy Science**. v.103, n.3, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17268>.

WILMS, J., WANG, G., DOELMAN, J., JACOBS, M., MARTÍN-TERESO, J. Intravenous calcium infusion in a calving protocol disrupts calcium homeostasis compared with an oral calcium supplement. **Journal of Dairy Science**. v.102, n.7, p.6056–6064, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15754>

## **4 HIPÓTESES**

### ARTIGO A

H<sub>1</sub>: A administração oral de formiato de cálcio no pós-parto imediato aumenta as concentrações de cálcio no soro sanguíneo de vacas holandesas recém-paridas de alta produção e diminui a ocorrência de hipocalcemia subclínica.

H<sub>1</sub>: A administração oral de formiato de cálcio no pós-parto imediato interfere com as concentrações de fósforo, de magnésio e de outros metabólitos no soro sanguíneo de vacas holandesas recém-paridas de alta produção.

H<sub>1</sub>: A administração oral de formiato de cálcio no pós-parto imediato diminui a ocorrência de doenças em vacas holandesas de alta produção no início da lactação.

### ARTIGO B

H<sub>1</sub>: A ingestão de dieta aniônica no período de transição pré-parto provoca alterações no equilíbrio eletrolítico em vacas holandesas recém-paridas de alta produção.

H<sub>1</sub>: A ingestão de dieta aniônica no período de transição pré-parto reduz a ocorrência de hipocalcemia subclínica em vacas holandesas recém-paridas de alta produção.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da administração oral de formiato de cálcio no pós-parto imediato e da ingestão de dieta aniônica no período de transição pré-parto sobre o equilíbrio metabólico de vacas leiteiras de alta produção recém-paridas e sobre a ocorrência de doenças no início da lactação.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### ARTIGO A

Testar se a administração oral de formiato de cálcio no pós-parto imediato aumenta as concentrações de cálcio no soro sanguíneo e diminui a ocorrência de hipocalcemia subclínica.

Testar se a administração oral de formiato de cálcio no pós-parto imediato interfere com as concentrações de fósforo, de magnésio e de outros constituintes no soro sanguíneo.

Testar se a administração oral de formiato de cálcio no pós-parto imediato diminui a ocorrência de doenças no início da lactação.

#### ARTIGO B

Testar se a ingestão de dieta aniônica no período de transição pré-parto provoca alterações no equilíbrio eletrolítico.

Testar se a ingestão de dieta aniônica no período de transição pré-parto reduz a ocorrência de hipocalcemia subclínica.

## 6 ARTIGO A

### **Efeito do tratamento com formiato de cálcio oral após o parto sobre a calcemia, metabólitos séricos e ocorrência de doenças no início da lactação de vacas leiteiras de alta produção<sup>1</sup>**

### **Effects of postpartum treatment with oral calcium formate on serum calcium, serum metabolites, and the occurrence of diseases at the beginning of lactation of high-producing dairy cows**

#### **Resumo**

Os objetivos do estudo foram avaliar os efeitos da administração oral do formiato de cálcio (Ca) no pós-parto imediato de vacas leiteiras de alta produção sobre a calcemia, sobre outros marcadores bioquímicos sanguíneos e sobre a ocorrência de doenças no início da lactação. Cento e vinte vacas hípidas HPB, distribuídas conforme a ordem de lactação (primeira, segunda, terceira e quarta a sexta lactação), foram tratadas ou não com formiato de Ca oral (duas doses: após o parto e 24 horas depois; equivalente a 50 g de Ca por dose), compondo 8 grupos (n=15). As seguintes variáveis foram mensuradas no soro sanguíneo de amostras colhidas após o parto (0h) e 24, 48, 72 e 96h depois: Ca total, fosfato, magnésio, ácidos graxos não esterificados, beta-hidroxibutirato (BHB), glicose, proteína total, albumina, ureia, aspartato aminotransferase e gama-glutamilttransferase. O BHB sanguíneo foi mensurado também aos 7, 14 e 21 dias de lactação. Para a avaliação da ocorrência de doenças as vacas foram distribuídas em tratadas (n=60) e não tratadas (n=60) e em hipocalcêmicas (n=71) e normocalcêmicas (n=49). ANOVA de medidas repetidas bifatorial e teste de qui-quadrado foram empregados para as comparações. A ordem de lactação não influenciou as variáveis estudadas, exceto a calcemia mais alta nas primíparas. O Ca sérico foi menor até 24h e elevou-se a partir de 48h e a hipocalcemia subclínica (HS) ([Ca] < 8,5 mg/dL) foi mais frequente nas vacas com número maior de lactações. O tratamento com formiato de Ca não produziu efeito sobre a variação do Ca e das demais variáveis estudadas nos primeiros dias de lactação. Vacas tratadas e não tratadas não diferiram quanto à produção de leite aos 21 dias, à apresentação de doenças no início da lactação, à taxa de descarte ou de morte até 60 dias pós-parto e à frequência de HS (60% e 58%, respectivamente). As vacas hipocalcêmicas adoeceram mais (64,8% vs. 42,9%; P=0,028) e apresentaram frequência maior de retenção de placenta (43% vs. 20,7%; P<0,001). A administração oral de formiato de Ca após o parto e 24 horas depois não se justifica como medida preventiva a ser adotada indiscriminadamente em rebanhos leiteiros. Estudos envolvendo números maiores de observação poderão esclarecer se o tratamento seletivo de vacas com maior risco de hipocalcemia é vantajoso.

**Palavras-chave:** bovinos leiteiros, doenças metabólicas, hipocalcemia subclínica, homeostase do cálcio, período de transição.

<sup>1</sup> Artigo redigido de acordo com as normas da revista Preventive Veterinary Medicine. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/journals/preventive-veterinary-medicine/0167-5877/guide-for-authors>>

## Abstract

This study aims to evaluate the effects of oral administration of calcium (Ca) formate in the postpartum of high-producing dairy cows on calcemia, on other blood biochemical markers and on the occurrence of diseases at the beginning of lactation. One hundred and twenty healthy Holstein cows, distributed according to the lactation order (first, second, third and fourth to sixth lactation), were treated or not with oral Ca formate (two doses: after calving and 24 hours later; equivalent to 50 g of Ca per dose), comprising 8 groups (n = 15). The following variables were measured in the blood serum of samples collected after calving (0h) and 24, 48, 72, and 96h after: total Ca, phosphate, magnesium, non-esterified fatty acids, beta-hydroxybutyrate (BHB), glucose, total protein, albumin, urea, aspartate aminotransferase and gamma-glutamyltransferase. Blood BHB was also measured at 7, 14, and 21 DIM (days in milk). For the assessment of disease occurrence, cows were distributed in treated (n = 60) and untreated (n = 60) and in hypocalcemic (n = 71) and normocalcemic (n = 49). Two-way repeated measures ANOVA and chi-square test were used for comparisons. The lactation order did not influence the studied blood constituents, except for the highest calcemia in primiparous cows. Serum Ca was lower up to 24h and increased after 48h and subclinical hypocalcemia (SCH) ([Ca] <8.5 mg/dL) was more frequent in cows with a higher number of lactations. Treatment with Ca formate had no effect on the variation of serum Ca and the other studied variables in the first days of lactation. Treated and untreated cows did not differ in terms of milk production at 21 DIM, the presentation of diseases at the beginning of lactation, the rate of discard or death up to 60 DIM and the frequency of SCH (60% and 58%, respectively). Hypocalcemic cows became more ill (64.8% vs. 42.9%; P = 0.028) and had a higher frequency of retained fetal membranes (43% vs. 20.7%; P <0.001). Oral administration of Ca formate after calving and 24 hours later is not justified as a preventive measure to be adopted indiscriminately in dairy herds. Studies involving larger numbers of observation may clarify whether the selective treatment of cows with a higher risk of hypocalcemia is advantageous.

**Keywords:** dairy cattle, metabolic disorders, subclinical hypocalcemia, calcium homeostasis, transition period.

## 1. Introdução

O período de transição, definido como o intervalo de tempo que compreende as três semanas que antecedem e que sucedem o parto, é uma fase crítica e determinante para a manutenção da saúde da vaca leiteira, para a eficiência na lactação e na reprodução e, conseqüentemente, para o retorno econômico em propriedades leiteiras. Este período coincide com mudanças drásticas no metabolismo das vacas, o que aumenta o risco da ocorrência de enfermidades metabólicas e infecciosas (Goff, 2008; LeBlanc et al., 2006).

A hipocalcemia, seja na forma clínica ou subclínica, é apontada como o principal desequilíbrio metabólico do pós-parto imediato, afetando principalmente vacas múltiparas nos primeiros dias de lactação (Leno et al., 2018; Oetzel, 2004). As vacas recém paridas de alta produção de leite podem ser incapazes de manter a homeostase do cálcio (Ca) frente à

demanda súbita provocada pela eliminação deste mineral em grande quantidade pelo colostro (Goff, 2004). A ocorrência de casos de paresia puerperal hipocalcêmica é relativamente baixa, mas a forma subclínica (concentração sérica de Ca < 8,5 mg/dL), por outro lado, pode afetar mais de 50% das vacas de um rebanho (Leno et al., 2018; Martinez et al., 2016a; Valdecabres et al., 2018) determinando prejuízos para a saúde e para a vida produtiva da vaca (Oetzel, 2013). A hipocalcemia subclínica (HS) está fortemente associada com a ocorrência de retenção de placenta, deslocamento do abomaso à esquerda, metrite, mastite e acetonemia (Goff, 2008; Jawor et al., 2012; Martinez et al., 2012; Rodríguez et al., 2016), e a sua prevenção é amplamente justificável.

Dentre as medidas que objetivam diminuir a incidência de HS em um rebanho, pode-se apontar a administração de sais de Ca por via oral após o parto. O Ca disponível em grande quantidade no lúmen intestinal é prontamente absorvido, de forma passiva, e contribui para a elevação imediata da calcemia (Oetzel, 2013). Esta forma de absorção depende, fundamentalmente, da quantidade de Ca solubilizado no lumen intestinal e independe da presença da vitamina D ativa (calcitriol) e da resposta dos enterócitos à mesma (Goff, 2014).

As eficiências da absorção de diferentes fontes de Ca, disponíveis em produtos comerciais ou não, tais como cloreto de Ca (Farnia et al., 2018; Goff and Horst, 1993; Hernandez et al., 1999; Oetzel, 1996; Queen et al., 1993), propionato de Ca (Goff and Horst, 1993; Goff et al., 1996), cloreto e sulfato de Ca combinados (Blanc et al., 2014; Domino et al., 2017; Martinez et al., 2016a, 2016b; Oetzel and Miller, 2012; Sampson et al., 2009), cloreto, sulfato, propionato e lactato de Ca combinados (Leno et al., 2018; Valdecabres et al., 2018), e propionato, carbonato e formiato de Ca combinados (Wilms et al., 2019), já foram comprovadas em vacas. De forma geral, os resultados demonstram que os incrementos da concentração sérica de Ca são transitórios e que os efeitos sobre a incidência de HS em rebanhos e sobre a ocorrência de outras doenças relacionadas são variáveis.

O formiato de Ca está presente na composição de um produto comercial introduzido recentemente no Brasil, que é indicado para a prevenção da HS. Embora o produto já seja utilizado há algum tempo em países da Europa, os autores do presente estudo desconhecem que resultados de investigações científicas tenham sido publicados anteriormente, excetuando-se o trabalho contemporâneo desenvolvido por Carneiro (2018). A hipótese testada foi a de que o tratamento com formiato de Ca por via oral após o parto contribuiria para a manutenção do equilíbrio metabólico e da saúde de vacas de produção leiteira elevada. Os objetivos do presente estudo foram avaliar os efeitos da administração oral do formiato de

Ca no pós-parto imediato de vacas leiteiras de alta produção sobre a calcemia, sobre outros marcadores bioquímicos sanguíneos e sobre a ocorrência de doenças no início da lactação.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Animais, manejo e grupos

O estudo foi conduzido entre novembro de 2017 e junho de 2018, em uma propriedade comercial produtora de leite localizada no município de Toledo, oeste paranaense, nas coordenadas geográficas 24° 42' 49" S, 53° 44' 35" W e altitude média de 560 m. A metodologia adotada no presente trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), sob o protocolo de número 13822.2017.94.

Utilizaram-se 120 fêmeas da raça Holandesa (HPB), híbridas, com produção média de 30 kg de leite/dia, pertencentes a uma única propriedade rural, onde permaneceram durante todo o período experimental. As vacas foram mantidas confinadas em sistema de *compost barn* com cama de maravalha e sistema de ventilação eficiente. Aos 60 dias pré-parto as fêmeas prenhes foram secas e alojadas em lote próprio. Aos 21 dias antes do parto previsto foram realocadas no lote do período de transição. Após o parto, os bezerros foram imediatamente separados e as vacas passaram para o lote de lactação. A ordenha era realizada três vezes ao dia (5h00, 13h30 e 21h00) empregando-se ordenhadeira mecânica. A primeira ordenha do colostro era realizada no próximo horário da rotina de ordenhas. A maior parte das vacas estudadas pariu durante a noite e foi ordenhada na primeira ordenha do dia.

Os critérios de inclusão estabelecidos para o estudo foram: escore de condição corporal (ECC) entre 3,0 e 3,5 ao parto e pH urinário com intervalo de 6,2 a 6,8, na semana que antecedeu o parto previsto. Vacas que tiveram gestação gemelar ou necessidade de auxílio ao parto não foram incluídas no estudo.

As vacas foram distribuídas, aleatoriamente, por oito grupos, com 15 animais cada, de acordo com a ordem de lactação e com a administração oral de formiato de Ca. Quatro ordens de lactação foram definidas: primeira (novilhas), segunda, terceira e quarta à sexta lactações. Em relação ao tratamento com formiato de Ca, foram compostos grupos controle (não tratados) e grupos tratados em cada uma das ordens de lactação. O tratamento foi constituído por administração oral de 350 mL de formiato de Ca (Calfon® oral; Bayer Saúde Animal), em dois momentos predeterminados após o parto: no dia do parto (até cinco horas após o

parto) e 24 horas depois. Em cada tratamento foi administrado o equivalente a 50g de Ca. Além do formiato de Ca, o produto utilizado apresenta cloreto de magnésio, ácido propiônico, aroma de baunilha com banana, polietilenolico ricinoleato gliceril, goma xantana e água em sua composição.

## 2.2 *Formulação e composição da dieta*

A dieta era oferecida aos animais duas vezes ao dia na forma de ração total misturada (RTM) e a água era disponível para consumo à vontade. As ofertas de RTM ocorriam às 8h00 e às 15h00. A dieta oferecida a partir dos 21 dias antes do parto foi calculada para vacas de alta produção e peso estimado em 650 kg e formulada para atingir diferença entre cátions e ânions na dieta (DCAD) negativa. A dieta oferecida a partir do parto foi calculada considerando-se o peso estimado de 580 kg, e a expectativa de que o leite produzido contivesse concentrações de 3,7% e 3% para gordura e proteínas, respectivamente. As características das dietas ofertadas antes e após o parto estão apresentadas na Tabela 1.

Amostra de cada tipo de dieta foi colhida direto do cocho e submetida a análise bromatológica e de minerais. A DCAD foi calculada pela equação:  $DCAD \text{ (mEq/100g MS)} = [(Na^+ + K^+) - (Cl^- + S^{-2})]$ . A conversão para a milésima parte do Equivalente (mEq), foi obtida a partir do peso atômico e da valência de cada cátion ou ânion, empregando-se a fórmula  $DCAD \text{ (mEq/100g MS)} = [(\% Na^+/0,023 + \% K^+/0,039) - (\% Cl^-/0,0355 + \% S^{-2}/0,016)]$ , e considerando o percentual dos cátions e ânions na MS.

## 2.3 *Procedimentos*

A produção de leite foi mensurada individualmente por meio de medidores de produção acoplados ao sistema de ordenha (Metatron 52, GEA® Westfalia, Alemanha). As medições foram realizadas nos dias 20 e 21 pós-parto, somando-se os valores dos três horários de ordenha. O valor médio dos volumes de leite produzidos nos dois dias foi admitido como o valor de produção de cada vaca.

O ECC foi avaliado em dois momentos: na última semana pré-parto e aos 21 de lactação. A avaliação baseou-se na escala de 1 a 5 (Edmonson et al., 1989) e utilizou-se o aplicativo BCS Cowditiion (Bayer Animal Health®, Alemanha) com a finalidade de minimizar a subjetividade da avaliação. A mensuração do pH da urina foi realizada uma única vez entre 7 e 10 dias antes do parto previsto. As amostras de urina foram obtidas com a micção

induzida por massagem na vulva e no períneo, e o pH foi mensurado nas amostras de urina frescas empregando-se pHmetro portátil (AKSO®; São Leopoldo, RS).

Amostras de sangue foram coletadas por punção da veia coccígea, utilizando-se tubos a vácuo sem anticoagulante e agulhas 21G (25 x 0,8 mm), em cinco momentos predefinidos: até 5 horas após o parto (logo depois da primeira ordenha do colostro) e 24, 48, 72 e 96 horas depois (logo após a ordenha de cada dia). Nas vacas tratadas, as duas primeiras coletas foram realizadas anteriormente à administração oral do formiato de Ca. Após a retração do coágulo, as amostras foram centrifugadas a 2.000 x g por oito minutos. O soro sanguíneo foi separado em alíquotas de 2 mL e conservado sob congelação (-20°C) até o momento do processamento laboratorial.

A concentração de glicose sanguínea foi determinada, imediatamente após a coleta, em gota de sangue remanescente na agulha utilizada para a punção da veia coccígea, utilizando-se analisador portátil para dosagem de glicemia (Freestyle Optium Neo®; Abbott; São Paulo, SP).

As seguintes variáveis foram mensuradas no soro sanguíneo com leitura em espectrofotômetro (Dimension Xpand Plus®; Siemens; São Paulo, SP) empregando-se reagentes comerciais específicos: Ca total por método colorimétrico com reação de arsenazo (CA Flex® reagent cartridge; Siemens), proteínas totais (PT) por método colorimétrico e técnica de biureto (TP Flex® reagent cartridge; Siemens), albumina (Alb) por método colorimétrico e técnica de verde de bromocresol (Albumina-PP; Gold Analisa Diagnóstica Ltda.), beta-hidroxibutirato (BHB) por método cinético-enzimático (Ranbut; Randox Laboratories Ltd, Reino Unido), ácidos graxos não esterificados (AGNE) por método colorimétrico (NEFA; Randox Laboratories Ltd, Reino Unido), ureia por método enzimático (BUN Flex® reagent cartridge; Siemens), magnésio (Mg) por método cinético com reação pelo xylydyl blue (Mg Flex® reagent cartridge; Siemens), e fosfato (P) por método colorimétrico com reação pelo molibdato (PHOS Flex® reagent cartridge; Siemens). A atividade sérica da aspartato aminotransferase (AST) foi determinada pelo método cinético (AST Flex® reagent cartridge; Siemens) e a atividade sérica da gama glutamiltransferase (GGT) foi determinada por método cinético utilizando-se como substrato glutamil-p-nitroanilida (GGT Flex® reagent cartridge; Siemens).

A concentração sanguínea de BHB também foi mensurada no 7º, 14º e 21º dias pós-parto com o emprego de analisador portátil (Ketovet®; ECO Diagnóstica, Nova Lima, MG) e uso de fitas reativas. A mensuração foi realizada em gota de sangue obtida por perfuração da pele da ponta da cauda, utilizando-se agulha 25 x 0,8 mm.

Para a caracterização das doenças que se apresentaram no período de transição pós-parto, as vacas foram mantidas sob vigilância constante até os 21 dias de lactação, e submetidas a exame físico específico de acordo com as necessidades (Dirksen et al., 1993). A retenção de placenta foi diagnosticada pela ausência de eliminação dos envoltórios fetais em até 24 horas após o parto. Para o diagnóstico da metrite consideraram-se os seguintes resultados: temperatura  $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$ , apatia, inapetência e presença de secreção vaginal. A mastite subclínica caracterizou-se por ausência de alteração nas características gerais do leite e da glândula mamária, associada a resultado positivo no *California Mastitis Test* (CMT) e a mastite clínica foi concluída pela presença de alterações no padrão de coloração e no aspecto do leite, e pela diminuição na produção do leite acompanhada por sinais de inflamação na glândula mamária.

A suspeita de anaplasmoze/babesiose baseou-se no aparecimento súbito de inapetência, queda na produção de leite, hipertermia ( $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$ ), mucosas pálidas com ou sem icterícia, redução aparente da frequência de ruminação, hipomotilidade reticulorruminal ( $< 5$  movimentos ruminais em 5 minutos), presença de infestação com carrapatos e melhora com o tratamento combinado de oxitetraciclina e diaceturato de diminazeno. O deslocamento do abomaso à esquerda foi diagnosticado com o aparecimento súbito de anorexia e de queda na produção de leite, e com a presença de som de “ping” metálico detectado com a percussão e auscultação simultâneas na região das últimas costelas esquerdas, sendo confirmado durante a laparotomia para a correção cirúrgica.

As seguintes evidências sustentaram a suspeita de pneumonia: aparecimento súbito de apatia, anorexia, hipertermia ( $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$ ) e queda na produção de leite, acompanhadas por taquipneia ( $> 40$  movimentos por minuto), dispneia mista, ruídos exacerbados à auscultação torácica e melhora com o uso sistêmico de antimicrobianos. A úlcera de sola e a dermatite interdigital foram diagnosticadas pela presença das lesões características na sola do dígito ou na pele do espaço interdigital, respectivamente, acompanhadas por alteração na postura e claudicação em decorrência das lesões. A inspeção dos dígitos ocorreu durante o procedimento rotineiro de casqueamento corretivo realizado em todas as vacas na terceira semana de lactação. O caso de cetose clínica caracterizou-se por aparecimento súbito de inapetência e queda na produção de leite associadas com valor sanguíneo elevado de BHB ( $\geq 2,9$  mmol/L). Valores de BHB  $> 1,2$  mmol/L foram admitidos como indicadores de cetose subclínica (LeBlanc et al., 2005; Oetzel, 2004).

## 2.4 Análise estatística

O estudo foi baseado em um delineamento inteiramente casualizado, utilizando fatorial duplo e levando em consideração três fatores: ordens de lactação, tratamento ou não com formiato de Ca e tempo relativo ao parto (dias pós-parto). Como o efeito da ordem de parição foi confirmado somente para a calcemia, todas as demais variáveis foram analisadas empregando-se análise de variâncias de medidas repetidas bifatorial, testando-se o efeito do tratamento com formiato de Ca (sim x não), o efeito de dias em lactação (parto, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h) e a interação entre os dois fatores. Nestes casos as ordens de lactação foram desconsideradas e a análise foi realizada considerando 60 vacas tratadas e 60 vacas não tratadas. No caso específico do Ca total, a análise consistiu no mesmo método estatístico, aplicado, porém, a cada ordem de lactação em separado ou a combinações das mesmas. Quando a estatística F provou-se significativa, o teste de Tukey foi empregado para comparação entre as médias.

Considerando os conjuntos de vacas tratadas com formiato de Ca (n=60) e vacas controle (n=60), assim como, os conjuntos de vacas que apresentaram hipocalcemia (n=71) e vacas que se mantiveram normocalcêmicas (n=49), a produção de leite aos 21 dias e o pH da urina pré-parto foram comparados por meio do teste t, enquanto o ECC pré-parto, o ECC aos 21 dias de lactação e a perda do ECC no início de lactação foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. A ocorrência de doenças, descarte ou morte nos primeiros 21 dias de lactação, assim como a ocorrência de desequilíbrios metabólicos subclínicos indicados por valores críticos de metabólitos mensurados foi comparada entre vacas tratadas ou não tratadas e entre vacas hipocalcêmicas e normocalcêmicas empregando-se o teste do qui-quadrado. Adotou-se como critério para definição de HS a ocorrência de dois ou mais valores consecutivos abaixo de 8,5 mg/dL para o Ca sérico (Farnia et al., 2018; Martinez et al., 2012; Oetzel, 2013).

A relação entre os valores de Ca e de AGNE foi avaliada por meio do teste de correlação de Pearson. Para todas as análises, foi admitida a probabilidade de erro de 5%. O programa SigmaPlot for Windows 3.1 foi utilizado para as análises estatísticas.

**Tabela 1**

Composição das dietas oferecidas nos períodos pré-parto e pós-parto, e valores recomendados pelo NRC (2001) para vacas leiteiras holandesas de alta produção.

	Pré-parto <sup>¶</sup>		Pós-parto	
	(kg MS/d)	% (MS)	(kg MS/d)	% (MS)
<b>Ingredientes</b>				
silagem de milho	7,00	66,13	5,95	41,36
feno de Tifton	0,65	6,14	1,20	7,09
soja em grão tostada	-	-	0,64	4,43
farelo de milho	1,06	9,98	2,64	18,37
farelo de soja	0,88	8,33	1,86	12,93
soja extrusada 46%	-	-	0,72	4,98
casquinha de soja	0,46	4,32	0,48	3,34
Açúcar	-	-	0,24	1,67
gordura protegida	-	-	0,14	1,00
núcleo mineral aniônico <sup>1</sup>	0,50	4,72	-	-
adsorvente de micotoxinas <sup>2</sup>	0,04	0,38	0,03	0,21
núcleo mineral <sup>3</sup>	-	-	0,48	3,30
NaCl	-	-	0,04	0,24
Ureia	-	-	0,06	0,44
tamponantes <sup>4</sup>	-	-	0,09	0,60
<b>Composição química</b>				
		Recomendado*		Recomendado*
Matéria seca (%)	36,51	42,40	47,98	53,20
Energia (Mcal/kg)	1,53	1,54 – 1,62	2,12	2,06
Proteína Bruta (%)	15,56	13,5 – 15,0	18,99	17,5
FDN (%)	37,0	25,0 – 33,0	39,58	25,0 – 33,0
FDA (%)	15,61	17,0 – 21,0	14,99	17,0 – 21,0
Extrato etéreo (%)	2,42	3,1	3,67	4,8 - 5,1
Ca (%)	0,65	0,40 – 0,44	0,68	0,74
P (%)	0,25	0,23 – 0,42	0,31	0,38
Mg (%)	0,47	0,40	0,32	0,27
K (%)	1,32	1,32 – 1,35	1,17	1,19
Na (%)	0,14	0,12 – 0,13	0,29	0,34
S (%)	0,37	0,20 – 0,40	0,24	0,20
Cl (%)	0,47	0,42 – 0,89	0,32	0,36
DCAD (mEq/100g MS)	3,33		18,86	

<sup>1</sup> Núcleo Pré-parto Aniônico Salus (Salus; Santo Antonio da Posse, SP); <sup>2</sup> Safetox Plus<sup>®</sup> (Safeeds; Cascavel, PR); <sup>3</sup> Núcleo Salus Lactação (Salus; Santo Antonio da Posse, SP); <sup>4</sup> Rumox<sup>®</sup> (Safeeds; Cascavel, PR); \* Dietas formuladas de acordo com o NRC (2001) para vacas holandesas de alta produção com peso aproximado de 650 kg antes do parto e de 580 kg no início da lactação. <sup>¶</sup> Tempo médio de consumo de 21 dias.

### 3. Resultados

As concentrações séricas de Ca total foram influenciadas pela ordem de lactação das vacas ( $P < 0,001$ ), distintamente das demais variáveis estudadas que não sofreram efeito deste fator ( $P > 0,05$ ). As diferenças foram marcantes ao parto e 24 horas após, momentos em que as

primíparas apresentaram valores maiores do que as vacas de terceira e de quarta a sexta lactações.

A calcemia variou ao longo dos cinco primeiros dias de lactação, mas o tratamento com formiato de Ca oral não influenciou os resultados (Tabela 2). De forma geral, as concentrações de Ca foram menores ao parto e 24 horas após, elevando-se a partir de 48 horas. O mesmo padrão de variação foi observado em vacas tratadas ou não tratadas com Ca oral (Figura 1).

Considerando o valor de 8,5 mg/dL como o limite inferior indicativo de normocalcemia, constatou-se que as vacas de terceira e de quarta a sexta lactações mantiveram valores médios reduzidos nos cinco primeiros dias de lactação. As vacas de primeira e de segunda lactação apresentaram, por outro lado, valores médios superiores ao limite inferior (Tabela 2).

O tratamento com formiato de Ca não influenciou os valores das demais variáveis mensuradas (Tabela 3). Em relação à variação ao longo do tempo, as concentrações de  $PO_4$  e de BHB e a atividade da AST se elevaram nos cinco primeiros dias de lactação, enquanto as concentrações de Mg, AGNE e Alb oscilaram discretamente no período. A glicemia apresentou-se mais alta imediatamente após o parto e manteve-se sem variação nos dias seguintes. Os valores de PT, ureia e GGT não se modificaram nos primeiros dias após o parto.

A produção de leite medida no final da terceira semana de lactação e o ECC ao parto e aos 21 dias pós-parto não diferiram entre as vacas tratadas ou não tratadas com Ca oral (Tabela 4). O tratamento com formiato de Ca também não diminuiu a frequência de doenças no início da lactação, assim como o número de vacas descartadas ou mortas entre 21 e 60 dias de lactação. Pouco mais que a metade das vacas tratadas e não tratadas apresentou algum tipo de alteração de saúde, destacando-se a retenção de placenta com ou sem metrite e a mastite subclínica. A HS ocorreu sem distinção nas vacas tratadas (60%) e não tratadas (58,3%), nos primeiros dias de lactação, e o mesmo se observou para a cetose subclínica nas primeiras três semanas de lactação.

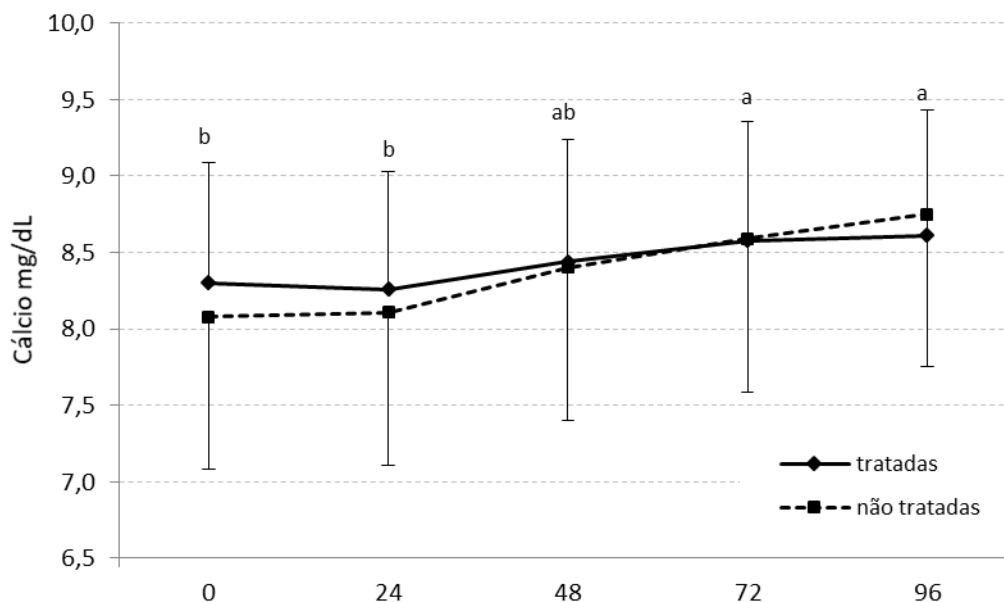
Independente do tratamento ou não com Ca oral, 71 vacas apresentaram HS no início da lactação. Comparadas às vacas que se mantiveram normocalcêmicas, as vacas hipocalcêmicas adoeceram mais e apresentaram frequência maior de retenção de placenta (Tabela 5). Quanto à produção de leite, ao ECC, à ocorrência de outras doenças, à frequência de cetose subclínica, e ao descarte e morte não se observaram diferenças.

**Tabela 2**

Concentrações médias de cálcio total (mg/dL), no soro sanguíneo de vacas holandesas de alta produção, de diferentes ordens de lactação, nos cinco primeiros dias de lactação, tratadas ou não com formiato de cálcio oral após o parto. Efeitos do tratamento, do tempo pós-parto e interação entre os dois fatores.

Ordem de lactação	n	Parto	24 h	48 h	72 h	96 h	EPM <sup>§</sup>	T* P	dpp <sup>†</sup> P	Interação P
1 <sup>a</sup>	30	8,84	8,81	8,68	8,77	8,83	0,110	0,883	0,736	0,037
2 <sup>a</sup>	30	8,61 <sup>b</sup>	8,61 <sup>b</sup>	8,78 <sup>ab</sup>	9,02 <sup>a</sup>	9,08 <sup>a</sup>	0,119	0,558	<0,001	0,841
3 <sup>a</sup>	30	8,12	8,00	8,27	8,44	8,48	0,159	0,854	0,062	0,433
4 <sup>a</sup> a 6 <sup>a</sup>	30	7,84 <sup>b</sup>	7,95 <sup>ab</sup>	8,23 <sup>ab</sup>	8,30 <sup>ab</sup>	8,48 <sup>a</sup>	0,182	0,732	0,008	0,127
1 <sup>a</sup> e 2 <sup>a</sup>	60	8,72 <sup>a</sup>	8,71 <sup>a</sup>	8,73 <sup>a</sup>	8,89 <sup>a</sup>	8,95 <sup>a</sup>	0,081	0,587	0,019	0,339
3 <sup>a</sup> a 6 <sup>a</sup>	60	7,98 <sup>b</sup>	7,98 <sup>b</sup>	8,25 <sup>ab</sup>	8,37 <sup>a</sup>	8,48 <sup>a</sup>	0,120	0,872	<0,001	0,233
1 <sup>a</sup> a 6 <sup>a</sup>	120	8,35 <sup>c</sup>	8,34 <sup>c</sup>	8,49 <sup>bc</sup>	8,63 <sup>ab</sup>	8,72 <sup>a</sup>	0,077	0,700	<0,001	0,083
2 <sup>a</sup> a 6 <sup>a</sup>	90	8,19 <sup>b</sup>	8,19 <sup>b</sup>	8,42 <sup>ab</sup>	8,58 <sup>a</sup>	8,68 <sup>a</sup>	0,093	0,713	<0,001	0,403

<sup>§</sup> EPM: erro padrão da média; \*T: tratamento com cálcio oral; <sup>†</sup> dpp: dias pós-parto; <sup>a,b,c</sup> letras diferentes na mesma linha representam diferença entre os momentos (P<0,05).



**Fig. 1.** Variação da calcemia (média e desvio-padrão), ao longo dos cinco primeiros dias de lactação (expressos em horas), em vacas holandesas de alta produção, de segunda à sexta lactação, que receberam (n=45) ou não (n=45) tratamento com formiato de cálcio oral no pós-parto. <sup>a,b,c</sup> letras diferentes representam diferença entre os momentos (P<0,05).

**Tabela 3**

Concentrações médias de fosfato (PO<sub>4</sub>), magnésio (Mg), ácidos graxos não-esterificados (AGNE), betahidroxibutirato (BHB), glicose, proteínas totais (PT), albumina (Alb), e ureia, e atividades de aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT) no soro sanguíneo de vacas holandesas de alta produção nos cinco primeiros dias de lactação, tratadas (n=60) ou não (n=60) com formiato de cálcio oral após o parto. Efeitos do tratamento, do tempo pós-parto e interação entre os dois fatores.

	Parto	24 h	48 h	72 h	96 h	EPM §	T* P	dpp <sup>†</sup> P	Interação P
PO <sub>4</sub> (mg/dL)	4,99 <sup>c</sup>	5,78 <sup>b</sup>	6,22 <sup>b</sup>	6,50 <sup>a</sup>	6,56 <sup>a</sup>	0,121	0,628	<0,001	0,026
Mg (mg/dL)	2,40 <sup>bc</sup>	2,61 <sup>a</sup>	2,52 <sup>ab</sup>	2,32 <sup>cd</sup>	2,27 <sup>d</sup>	0,042	0,913	<0,001	0,443
AGNE (mmol/L)	0,69 <sup>ab</sup>	0,66 <sup>b</sup>	0,75 <sup>ab</sup>	0,80 <sup>a</sup>	0,73 <sup>ab</sup>	0,046	0,605	0,024	0,356
BHB (mmol/L)	0,48 <sup>c</sup>	0,52 <sup>bc</sup>	0,63 <sup>b</sup>	0,71 <sup>ab</sup>	0,76 <sup>a</sup>	0,040	0,934	<0,001	0,436
Glicose (mg/dL)	108,42 <sup>a</sup>	76,60 <sup>b</sup>	72,10 <sup>b</sup>	68,71 <sup>b</sup>	67,57 <sup>b</sup>	1,924	0,936	<0,001	0,718
PT (g/dL)	6,82	6,80	6,82	6,85	6,85	0,052	0,697	0,773	0,453
Alb (g/dL)	2,66 <sup>ab</sup>	2,67 <sup>a</sup>	2,68 <sup>a</sup>	2,59 <sup>ab</sup>	2,55 <sup>b</sup>	0,036	0,690	0,005	0,125
Ureia (mg/dL)	27,70 <sup>a</sup>	29,70 <sup>a</sup>	29,88 <sup>a</sup>	29,73 <sup>a</sup>	30,07 <sup>a</sup>	0,962	0,365	0,037	0,050
AST (UI/L)	68,92 <sup>c</sup>	75,99 <sup>b</sup>	85,13 <sup>a</sup>	82,97 <sup>a</sup>	86,91 <sup>a</sup>	2,075	0,944	<0,001	0,217
GGT (UI/L)	26,50	26,37	26,46	26,62	27,02	0,829	0,359	0,804	0,932

§ EPM: erro padrão da média; \*T: tratamento com cálcio oral; † dpp: dias pós-parto; <sup>a,b,c</sup> letras diferentes na mesma linha representam diferença entre os momentos (P<0,05).

**Tabela 4**

Ocorrências observadas em vacas holandesas de alta produção no início da lactação tratadas ou não com formiato de cálcio oral após o parto.

Ocorrências	Vacas não tratadas n=60	Vacas tratadas n=60	P
Produção de leite 21 DIM (L)	30,99±7,33	28,86±8,33	0,140
ECC ao parto	3,25 (3,0 3,5)	3,25 (3,0 3,5)	0,483
ECC 21 DIM	2,75 (2,5 2,9)	2,75 (2,5 3,0)	0,766
Perda de ECC	0,5 (0,5 0,75)	0,5 (0,5 0,75)	0,204
pH da urina 7 a 10 dias pré-parto	6,65±0,30	6,73±0,32	0,187
Retenção de placenta com ou sem metrite	20 (40,8%)	17 (32,7%)	0,693
Mastite subclínica <sup>†</sup>	9 (18,4%)	13 (25,0%)	0,479
Mastite clínica	4 (8,1%)	5 (9,65)	1,000*
Anaplasmose/Babesiose	4 (8,1%)	5 (9,6%)	1,000*
Úlcera de sola com claudicação	4 (8,1%)	3 (5,7%)	1,000*
Deslocamento abomasal à esquerda	3 (6,1%)	4 (7,7%)	1,000*
Metrite	2 (4,1%)	2 (3,8%)	1,000*
Pneumonia	1 (2%)	2 (3,8%)	1,000*
Dermatite interdigital com claudicação	1 (2%)	1 (1,9%)	1,000*
Cetose clínica	1 (2%)	0 (0%)	1,000*
Total de doenças observadas	49 (100%)	52 (100%)	
Vacas que se mantiveram sadias	26 (43,3%)	27 (45%)	1,000
Balanço energético negativo			
Pós-parto imediato (AGNE >0,6 mmol/L)**	33	27	0,307
Pós-parto imediato (BHB >1,2 mmol/L)**	6	10	0,413
Início da lactação (BHB >1,2 mmol/L) <sup>§</sup>	32	26	0,361
Cetose primária subclínica (BHB >2,9 mmol/L) <sup>§‡</sup>	3	5	1,000*
Hipocalcemia subclínica no pós-parto imediato <sup>†</sup>	35	36	1,000
Descarte entre 21 e 60 DIM	10	16	0,263
Morte entre 21 e 60 DIM	4	4	1,000

<sup>†</sup> diagnóstico baseado no resultado do CMT; \* poder do teste reduzido; \*\* mensuração realizada em 50 vacas de cada grupo; <sup>§</sup> mensuração nos dias 7, 14 ou 21 dias pós-parto; <sup>†</sup> dois ou mais valores consecutivos < 8,5 mg/dL; <sup>‡</sup> valores elevados de BHB compatíveis com cetose e ausência de manifestações clínicas.

**Tabela 5**

Ocorrências observadas em vacas holandesas de alta produção no início da lactação que desenvolveram hipocalcemia subclínica ou que se mantiveram normocalcêmicas independente de terem sido tratadas com formiato de cálcio oral após o parto.

Ocorrências	Vacas hipocalcêmicas <sup>†</sup> n=71	Vacas normocalcêmicas n=49	P
Produção de leite 21DIM (L)	29,03±8,67	31,23±6,45	0,132
ECC ao parto	3,25 (3,0 3,5)	3,25 (3,0 3,5)	0,807
ECC 21 DIM	2,75 (2,5 3,0)	2,75 (2,5 2,75)	0,884
Perda de ECC	0,5 (0,5 0,75)	0,5 (0,5 0,75)	0,693
pH da urina 7 a 10 dias pré-parto	6,71±0,32	6,67±0,29	0,501
Retenção de placenta com ou sem metrite	31 (43%)	6 (20,7%)	<0,001
Mastite subclínica <sup>‡</sup>	11 (15,3%)	11 (37,9%)	0,467
Mastite clínica	6 (8,3%)	3 (10,3%)	0,902*
Anaplasmosse/Babesiose	7 (9,7%)	2 (6,9%)	0,407*
Úlcera de sola com claudicação	7 (9,7%)	0 (0%)	0,062*
Deslocamento abomasal à esquerda	6 (8,3%)	1 (3,4%)	0,282*
Metrite	1 (1,4%)	3 (10,3%)	0,370*
Pneumonia	3 (4,2%)	0 (0%)	0,388*
Dermatite interdigital com claudicação	0 (0%)	2 (6,9%)	0,322*
Cetose clínica	0 (0%)	1 (3,4%)	0,851*
Total de doenças observadas	72 (100%)	29 (100%)	
Vacas que se mantiveram sadias	25 (35,2%)	28 (57,1%)	0,028
Balanço energético negativo			
Pós-parto imediato (AGNE >0,6mmol/L)**	40	21	0,650
Pós-parto imediato (BHB >1,2 mmol/L)**	14	2	0,053
Início da lactação (BHB >1,2 mmol/L) <sup>§</sup>	39	19	0,229
Cetose primária subclínica (BHB >2,9 mmol/L) <sup>§ ‡</sup>	6	2	0,407*
Descarte entre 21 e 60 DIM	18	8	0,340
Morte entre 21 e 60 DIM	6	2	0,568*

<sup>†</sup> dois ou mais valores consecutivos < 8,5 mg/dL; <sup>‡</sup> diagnóstico baseado no resultado do CMT; \* poder do teste reduzido; \*\* mensuração realizada em 63 vacas hipocalcêmicas e 37 vacas normocalcêmicas; <sup>§</sup> mensuração nos dias 7, 14 ou 21 dias pós-parto; <sup>‡</sup> valores elevados de BHB compatíveis com cetose e ausência de manifestações clínicas.

#### 4. Discussão

Com base nos resultados pode-se afirmar que a HS era um problema de importância destacada nas vacas recém paridas da propriedade onde o estudo foi desenvolvido. Adotando-se os critérios de valores de concentração sérica de Ca inferiores a 8,5 mg/dL (Farnia et al., 2018; Martinez et al., 2012; Oetzel, 2013), por dois ou mais dias consecutivos, como definidores de HS, foi possível verificar que o desequilíbrio esteve presente em 37%, 47%, 77% e 77% das vacas na primeira, segunda, terceira e quarta a sexta lactações,

respectivamente, acometendo 59% das vacas incluídas no estudo. Isto confirma também que a situação foi mais crítica nas vacas com três ou mais lactações, pois a calcemia foi mantida em valores médios inferiores ao valor crítico admitido ao longo dos cinco primeiros dias de lactação (Tabela 2). As observações são coerentes com evidências anteriores em rebanhos de vacas HPB de alta produção (Leno et al., 2018; Martinez et al., 2016b), e reforçam que as vacas mais velhas possuem maior dificuldade para manter a calcemia no pós-parto imediato (Martinez et al., 2016a; Reinhardt et al., 2011).

O tratamento com formiato de Ca oral não contribuiu para aumentar a calcemia ou para reverter a HS nos primeiros dias de lactação (Tabela 2 e Figura 1), observando-se frequências parecidas do desequilíbrio em vacas tratadas e não tratadas (Tabela 4). Resultados similares foram observados no outro estudo em que se realizou administração de formiato de Ca (Carneiro, 2018), e não diferem, de forma geral, daqueles obtidos com a administração de outros sais de Ca (Blanc et al., 2014; Domino et al., 2017; Farnia et al., 2018; Hernandez et al., 1999; Leno et al., 2018; Oetzel and Miller, 2012; Sampson et al., 2009; Wilms et al., 2019). Efeitos positivos da administração de Ca oral sobre a calcemia foram, no entanto, verificados em outras investigações em que se realizaram número maior de administrações iniciando 12 horas pré-parto (Oetzel, 1996), número maior de administrações com as primeiras doses duplicadas (Martinez et al., 2016a; 2016b), e o tratamento em vacas da raça Jersey (Goff et al., 1996; Valdecabres et al., 2018), sabidamente mais predispostas do que as vacas HPB a desenvolverem HS (Goff, 2008; 2014).

A ausência de efeito do tratamento com Ca sobre a calcemia pode ser explicada pelo tipo de procedimento adotado no presente estudo, relacionado aos momentos em que as coletas de sangue foram realizadas. No estudo de Carneiro (2018), a curva de calcemia observada após a ingestão de formiato de Ca indica claramente que a absorção do Ca ocorreu muito rapidamente após a ingestão do produto. Em comparação com as vacas não tratadas, as concentrações séricas mantiveram-se mais altas entre 30 minutos e 4 horas após a administração. A diferença na calcemia de vacas tratadas ou não tratadas já estava ausente oito e 24 horas após a ingestão. Isto comprova que a absorção do Ca foi eficiente e que a calcemia se elevou rapidamente. Porém, este efeito não foi duradouro. Interessante ressaltar que as vacas, originalmente hipocalcêmicas, tornaram-se normocalcêmicas durante as primeiras quatro horas e retornaram ao estado de HS a partir de oito horas. Neste mesmo estudo, diferenças não foram observadas entre vacas que receberam ou não Ca oral quando as coletas de sangue foram realizadas a cada 12 ou 24 horas depois da ingestão (Carneiro, 2018).

O efeito pouco duradouro de elevação da calcemia também foi verificado com a ingestão de outros tipos de sais de Ca, aplicados diluídos em água (Farnia et al., 2018; Goff and Horst, 1993), na forma de gel (Queen et al., 1993) ou na forma de cápsula (Martinez et al., 2016b; Sampson et al., 2009). Concentrações séricas de Ca mais altas foram mantidas por até somente quatro ou seis horas após a administração e este parece ser o padrão de variação da curva calcêmica. Com base nestas informações é coerente supor que a calcemia provavelmente aumentou nas vacas estudadas que receberam formiato de Ca. Porém, isto não ficou demonstrado porque a mensuração de Ca sérico foi realizada 24 horas após cada uma das duas aplicações do produto.

Embora exista pouca informação científica sobre o formiato de Ca, o insucesso aparente do tratamento testado não deve ser atribuído ao tipo de composto utilizado. O maior número das informações disponíveis envolve o uso do cloreto de Ca (Farnia et al., 2018; Goff and Horst, 1993; Hernandez et al., 1999; Oetzel, 1996; Queen et al., 1993), e do cloreto e sulfato de Ca combinados (Blanc et al., 2014; Domino et al., 2017; Martinez et al., 2016a; 2016b; Oetzel and Miller, 2012; Sampson et al., 2009), e os resultados não comprovam, de forma geral, que este tipo de medida seja realmente eficaz para evitar ou reverter a HS. O fator crítico determinante para a eficácia dos diferentes sais de Ca em produzir incremento da calcemia é a rapidez e a facilidade com que o Ca é absorvido no intestino, e a dose equivalente a 50 g de Ca, como a utilizada no presente estudo e recomendada pelo fabricante do produto, é considerada ideal (Oetzel, 2013). O Ca ionizado presente no lúmen intestinal se movimenta por difusão passiva entre as células epiteliais em direção ao espaço fluido extracelular a favor do gradiente de concentração e este mecanismo depende de que grande quantidade de Ca solubilizado esteja presente ao mesmo tempo no intestino (Goff, 2014).

Além do desequilíbrio relacionado ao Ca, as vacas estudadas apresentavam desequilíbrio do metabolismo energético com valores médios elevados de AGNE no pós-parto imediato (Tabela 3). Os demais constituintes séricos mensurados situaram-se, por outro lado, dentro do intervalo de variação fisiológica admitido para a espécie (Kaneko et al., 2008). A hiperglicemia presente logo após o parto destaca-se e reforça observações prévias (Lopera et al., 2018; Janovick et al., 2011; Wilms et al., 2019), ocorrendo como resultado da condição de estresse relacionada ao trabalho de parto. As variações das concentrações de P e de Mg ao longo das primeiras 96 horas de lactação assemelham-se às observadas em estudo anterior (Lopera et al., 2018), caracterizando situação fisiológica. A hipomagnesemia, considerada, atualmente, o principal fator de risco para o desenvolvimento de HS em vacas recém paridas (Goff, 2008; 2014), não estava presente nas vacas estudadas em nenhum grupo ou momento.

Não pode, portanto, ser apontada como um fator de interferência nos resultados do tratamento com formiato de Ca.

Os valores médios de AGNE apresentaram-se pouco acima do limite crítico de 0,6 mmol/L (Tabela 3), indicando que as vacas iniciaram a lactação em situação de balanço energético negativo, com atividade aumentada de mobilização de tecido adiposo (Goff, 2008; Reinhardt et al., 2011). Esta situação foi verificada em 66% (33/50) das vacas não tratadas e 54% (27/50) das vacas tratadas (Tabela 4). O desequilíbrio do metabolismo energético pode ser admitido como de baixa intensidade até 96 horas de lactação uma vez que as concentrações de BHB eram fisiológicas, comprovando que não havia síntese aumentada de corpos cetônicos. Pode-se admitir que o aumento de AGNE no pós-parto imediato teve relação com a HS, pois 90% (54/60) destas vacas eram também hipocalcêmicas. Por outro lado, a correlação entre as concentrações séricas de AGNE e de Ca nos primeiros dias de lactação provou-se fraca ( $r = -0,136$ ;  $P=0,002$ ). A maioria (47/60; 78%) das vacas que apresentavam AGNE elevado no pós-parto imediato mantiveram balanço energético negativo durante o período de transição pós-parto, demonstrando valores elevados de BHB aos 7 ( $1,53 \pm 0,63$  mmol/L), 14 ( $1,45 \pm 0,95$  mmol/L) ou 21 ( $1,21 \pm 0,53$  mmol/L) dias de lactação. A hipercetonemia nas três semanas iniciais da lactação foi observada em 58% (35/60) das vacas não tratadas e em 51% (31/60) das que receberam formiato da Ca (Tabela 4). A maioria delas (67%; 44/66) era também hipocalcêmica nos primeiros dias pós-parto. Contudo, quando as vacas foram reagrupadas em hipocalcêmicas ou normocalcêmicas, independentemente de terem recebido tratamento, a associação entre os desequilíbrios não foi confirmada (Tabela 5).

A relação entre HS e o balanço energético negativo já foi comprovada anteriormente em vacas leiteiras de alta produção (Martinez et al., 2012; Valldecabres et al., 2018). A menor ingestão de matéria seca que ocorre secundariamente à hipomotilidade do trato digestório nas vacas com HS tem sido apontada como a causa da relação entre os dois desequilíbrios, explicando que a HS aumenta o risco de ocorrência de cetose subclínica (Chapinal et al., 2011; Goff, 2008; 2014). Mecanismos mais complexos e ainda não completamente esclarecidos devem estar provavelmente envolvidos na relação entre os desequilíbrios do metabolismo do Ca e do metabolismo energético nas vacas leiteiras de alta produção. Um exemplo disto é a constatação de que a HS induzida provoca redução da concentração plasmática de insulina, e conseqüente elevação da glicemia e da concentração de AGNE (Martinez et al., 2014). Os autores levantaram a hipótese de que a HS pode comprometer a liberação deste hormônio pelas células pancreáticas, em virtude do papel que o Ca desempenha como segundo mensageiro celular.

Pode-se admitir que a administração de formiato de Ca não interferiu com a ocorrência do balanço energético negativo nas vacas incluídas no estudo. O mesmo pode ser assumido para a produção de leite aos 21 dias, para a perda de ECC no início da lactação, para a frequência de diferentes doenças comuns no período de transição pós-parto e para o número de vacas que foram descartadas ou que morreram entre 21 e 60 dias em lactação (Tabela 4). A medida adotada não provocou efeitos em nenhuma destas ocorrências e as vacas tratadas ou não tratadas comportaram-se com padrão semelhante. Isto indica, em princípio, que a administração de Ca oral no pós-parto imediato não contribui para a prevenção de problemas de saúde que a vaca enfrenta no período inicial da lactação, o que está em acordo com investigações anteriores (Carneiro, 2018; Goff et al., 1996; Hernandez et al., 1999; Martinez et al., 2016b; Oetzel and Miller, 2012), mas contraria os achados de outros pesquisadores (Domino et al., 2017; Leno et al., 2018; Oetzel, 1996).

Entretanto, estes resultados relacionados às ocorrências de doenças devem ser interpretados com cautela porque o número de animais estudados foi reduzido, o que, conseqüentemente, diminuiu o número de ocorrências observadas e o poder do teste empregado para a comparação estatística. Em estudos com número igualmente pequeno de vacas, comprovou-se que o uso de Ca oral reduziu a incidência de hipocalcemia clínica e de deslocamento do abomaso à esquerda, sem modificar a de retenção de placenta (Oetzel, 1996), ou que, assim como no presente estudo, não interferiu com a ocorrência de doenças (Goff et al., 1996; Hernandez et al., 1999). Naqueles em que o número de vacas incluídas foi alto, a ingestão de sais de Ca promoveu redução na incidência de doenças (Leno et al., 2018), e, especificamente de mastite (Domino et al., 2017), em vacas multíparas, ou também não resultou em benefício para a saúde (Oetzel and Miller, 2012). Na única investigação anterior com a utilização de formiato de Ca, a medida não afetou as incidências de retenção de placenta, metrite, cetose clínica, cetose subclínica e mastite, mas reduziu a ocorrência de deslocamento abomasal à esquerda (Carneiro, 2018).

Analisados em conjunto, os resultados dos diferentes estudos indicam que a eficácia da administração de Ca oral após o parto como medida preventiva para HS e para doenças no início da lactação é questionável. Dependendo da situação prévia de risco, determinadas categorias dentro de um rebanho leiteiro poderão beneficiar-se, tais como vacas multíparas que apresentaram produção leiteira muito acima da média do rebanho na lactação anterior (Domino et al., 2017; Martinez et al., 2016a; Oetzel and Miller, 2012), vacas multíparas que claudicam (Leno et al., 2018; Oetzel and Miller, 2012) e vacas multíparas com ECC alto ao parto ou com HS comprovada ao parto (Leno et al., 2018). O uso de sais de Ca por via oral

em todas as vacas recém paridas, indistintamente, é uma recomendação que não possui sustentação em evidências científicas e que, provavelmente, não determina relação custo/benefício vantajosa. O tratamento efetuado, com a administração de duas doses de formiato de Ca gera o custo total de R\$ 84,00 (US\$ 19,67) por vaca, o que equivale a aproximadamente 58 litros de leite (R\$1,44/L), de acordo com o valor atual pago ao produtor.

Neste estudo pôde-se concluir que a administração oral de formiato de Ca após o parto e 24 horas depois não se justifica como medida preventiva a ser adotada indiscriminadamente em rebanhos leiteiros de alta produção, uma vez que não interferiu com a ocorrência de hipocalcemia subclínica e não reduziu a frequência de doenças no início da lactação. Estudos envolvendo números maiores de observação poderão esclarecer se o tratamento seletivo de vacas com maior risco de hipocalcemia seria vantajoso.

## Referências

- 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. *J. Dairy Sci.* 97, 6901-6906. [http://doi: 10.3168/jds.2014-7927](http://doi:10.3168/jds.2014-7927).
- Carneiro, E.W. Efeito do uso de formiato de cálcio via oral no pós-parto imediato sobre a hipocalcemia em vacas leiteiras. 2018. 134p. Tese (Doutorado) –Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, 2018.
- Chapinal, N., Carson, M., Duffield, T.F., Capel, M., Godden, S., Overton, M., Santos, J.E., LeBlanc, S.J., 2011. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *J. Dairy Sci.* 94, 4897-4903. [http://doi: 10.3168/jds.2010-4075](http://doi:10.3168/jds.2010-4075).
- Dirksen, G., Gründer, H.D., Stöber, M., 1993. In: Rosenberger: Exame Clínico dos Bovinos, *Ibid.* (Eds.), Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 420p.
- Domino, A.R., Korzec, H.C., McArt, J.A.A., 2017. Field trial of 2 calcium supplements on early lactation health and production in multiparous Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 100, 9681-9690. [http://doi: 10.3168/jds.2017-12885](http://doi:10.3168/jds.2017-12885).
- Edmonson, A.J., Lean, I.J., Weaver, L.D., Farver, T., Webster, G., 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72, 68-78. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79081-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79081-0).
- Farnia, S.A., Rasooli, A., Nouri, M., Shahryaric, A., Bakhtiaryd, M.K., Constable, P.D., 2018. Effect of postparturient oral calcium administration on serum total calcium concentration in Holstein cows fed diets of different dietary cation-anion difference in late gestation. *Res Vet Sci.* 117, 118-124. <http://doi:10.1016/j.rvsc.2017.11.017>.

- Goff, J.P., 2004. Macromineral disorders of the transition cow. *Vet Clin Food Anim.* 20, 471–494. : <http://doi:10.1016/j.cvfa.2004.06.003>.
- Goff, J.P., 2008. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Vet. J.* 176, 50–57. <http://doi:10.1016/j.tvjl.2007.12.020>.
- Goff, J.P., 2014. Calcium and magnesium disorders. *Vet Clin Food Anim.* 30, 359–381. <http://doi:10.1016/j.cvfa.2014.04.003>.
- Goff J.P., Horst, R.L., 1993. Oral administration of calcium salts for treatment of hypocalcemia in cattle. *J. Dairy Sci.* 76, 101-108. [http://doi:10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77328-2](http://doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77328-2).
- Goff J.P., Horst, R.L., Jardon, P.W., Borelli, C., Wedam, J., 1996. Field trials of an oral calcium propionate paste as an aid to prevent milk fever in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79, 378-383. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76375-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76375-0).
- Hernandez J., Risco, C.A., Elliott, J.B., 1999. Effect of oral administration of a calcium chloride gel on blood mineral concentrations, parturient disorders, reproductive performance, and milk production of dairy cows with retained fetal membranes. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215, 72-76.
- Janovick, N.A., Boisclair, Y.R., Drackley, J.K., 2011. Prepartum dietary energy intake affects metabolism and health during the periparturient period in primiparous and multiparous Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 94, 1385–1400. <http://doi:10.3168/jds.2010-3303>.
- Jawor, P.E., Huzzey, J.M., Leblanc, S.J., Von Keyserlingk, M.A.G., 2012. Associations of subclinical hypocalcemia at calving with milk yield, and feeding, drinking, and standing behaviors around parturition in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 95, 1240–1248. <http://doi:10.3168/jds.2011-4586>.
- Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L., 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. Academic Press, London. 932p.
- LeBlanc, S.J., Leslie, K.E., Duffield, T.F., 2005. Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 88, 159-170. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72674-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72674-6).
- LeBlanc, S.J., Lissemore, K.D., Kelton, D.F., Duffield, T.F., Leslie, K.E., 2006. Major Advances in Disease Prevention in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 89, 1267–1279. [http://doi:10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72195-6](http://doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72195-6).
- Leno, B.M., Neves, R.C., Louge, I.M., Curler, M.D., Thomas, M.J., Overton, T.R., McArt, J.A.A., 2018. Differential effects of a single dose of oral calcium based on postpartum

- plasma calcium concentration in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 101, 3285-3302. <http://doi:10.3168/jds.2017-13164>.
- Lopera, C., Zimpel, R., Vieira-Neto, A., Lopes, F.R., Ortiz, W., Poindexter, M., Faria, B.N., Gambarini, M.L., Block, E., Nelson, C.D., Santos, J.E.P., 2018. Effects of level of dietary cation-anion difference and duration of prepartum feeding on performance and metabolism of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101, 7907–7929. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14580>.
- Martinez, N., Sinedino, L.D.P., Bisinotto, R.S., Daetz, R., Lopera, C., Risco, C.A., Galvão, K.N., Thatcher, W.W., Santos, J.E.P., 2016a. Effects of oral calcium supplementation on mineral and acid-base status, energy metabolites, and health of postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99, 8397-8416. <http://doi:10.3168/jds.2015-10527>.
- Martinez, N., Sinedino, L.D.P., Bisinotto, R.S., Daetz, R., Risco, C.A., Galvão, K.N., Thatcher, W.W., Santos, J.E.P., 2016b. Effects of oral calcium supplementation on productive and reproductive performance in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 99, 8417–8430. <http://doi:10.3168/jds.2015-10529>.
- Martinez, N., Sinedino, L.D.P., Bisinotto, R.S., Ribeiro, E.S., Gomes, G.C., Lima, F.S., Greco, L.F., Risco, C.A., Galvão, K.N., Taylor-Rodriguez, D., Driver, J.P., Thatcher, W.W., Santos, J.E.P., 2014. Effect of induced hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97, 874-887. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7408>.
- Martinez, N., Risco, C.A., Lima, F.S., Bisinotto, R.S., Greco, L.F., Ribeiro, E.S., Maunsell, F., Galvão, K., 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. *J. Dairy Sci.* 95, 7158–7172. <http://doi:10.3168/jds.2012-5812>.
- National Research Council., 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th ed. National Academy Press, Washington, DC. 260p.
- Oetzel, G.R., 2013. Oral calcium supplementation in peripartum dairy cows. *Vet Clin Food Anim.* 29, 447–455. <http://doi:10.1016/j.cvfa.2013.03.006>.
- Oetzel, G.R., Miller, B.E., 2012. Effect of oral calcium bolus supplementation on early lactation health and milk yield in commercial dairy herds. *J. Dairy Sci.* 95, 7051–7065. <http://doi:10.3168/jds.2012-5510>.
- Oetzel, G.R., 2004. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Vet Clin Food Anim.* 20, 651–674. <http://doi:10.1016/j.cvfa.2004.06.006>.

- Oetzel G.R., 1996. Effect of calcium chloride gel treatment in dairy cows on incidence of periparturient diseases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209, 958-961.
- Queen, G., Miller, G.Y., Masterson, M.A., 1993. Effects of oral administration of a calcium-containing gel on serum calcium concentration in postparturient dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202, 607-609.
- Reinhardt, T.A., Lippolis, J.D., Mccluskey, B.J., Goff, J.P., Horst, R.L., 2011. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Vet. J.* 188, 122–124. <http://doi:10.1016/j.tvjl.2010.03.025>.
- Rodríguez, E.M., Arís, A., Bach, A., 2016. Associations between subclinical hypocalcemia and postparturient diseases in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100, 7427–7434. <http://doi:10.3168/jds.2016-12210>.
- Sampson, J.D., Spain, J.N., Jones, C., Carstensen, L., 2009. Effects of calcium chloride and calcium sulfate in an oral bolus given as a supplement to postpartum dairy cows. *Vet. Ther.* 10, 131-139.
- Valdecabres, A., Pires, J.A.A., Silva-Del-Río, N., 2018. Effect of prophylactic oral calcium supplementation on postpartum mineral status and markers of energy balance of multiparous Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 101, 4460–4472. <http://doi:10.3168/jds.2017-12917>.
- Wilms, J., Wang, G., Doelman, J., Jacobs, M., Martín-Tereso, J., 2019. Intravenous calcium infusion in a calving protocol disrupts calcium homeostasis compared with an oral calcium supplement. *J. Dairy Sci.* 102, 6056–6064. <http://doi:10.3168/jds.2018-15754>.

## 7 ARTIGO B

**DIETA ANIÔNICA PRÉ-PARTO PROVOCA ACIDOSE HIPERCLORÊMICA EM VACAS LEITEIRAS DE ALTA PRODUÇÃO MAS NÃO EVITA A HIPOCALCEMIA SUBCLÍNICA<sup>2</sup>**

*Prepartum anionic diet induces hyperchloremic acidosis in high-producing dairy cows without preventing subclinical hypocalcemia*

**RESUMO.-** Os objetivos do estudo foram avaliar os efeitos que a dieta aniônica pré-parto provoca sobre o equilíbrio eletrolítico e sobre a calcemia de vacas leiteiras de alta produção nos primeiros dias de lactação, e verificar o impacto sobre a frequência da hipocalcemia subclínica. Sessenta fêmeas híginas HPB, com produção de 30 kg de leite/dia, manejadas em sistema intensivo (*compost barn*), foram distribuídas por grupos (n=15) de acordo com a ordem de parição: primeira, segunda, terceira e quarta a sexta. Nas três semanas pré-parto receberam dieta com DCAD negativa (-6 mEq/100g MS) e teor de cloreto elevado. Após o parto receberam dieta com DCAD positiva (18 mEq/100g MS). O pH da urina foi mensurado antes do parto. As concentrações séricas de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup> e Ca total e a SID<sub>3</sub> foram determinadas em amostras colhidas ao parto (0h), 24, 48, 72 e 96h após. As frequências de hipocalcemia subclínica foram determinadas considerando-se o valor crítico de 8,5 mg/dL. ANOVA de medidas repetidas bifatorial e teste de qui-quadrado foram empregados para as comparações. As vacas eliminavam urina ácida antes do parto. Os valores de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e SID<sub>3</sub> não diferiram entre os grupos. Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> não variaram entre os dias; Cl<sup>-</sup> era elevado ao parto e diminuiu até 72h; e SID<sub>3</sub> era reduzida ao parto e aumentou até 48h. A calcemia era reduzida até 24h e se elevou até 72h. Vacas de terceira e de quarta a sexta lactações apresentaram valores reduzidos até 24h. A hipocalcemia foi observada em quase metade das vacas (43,3% a 55%) até 48h. A manutenção de hipocalcemia por três ou mais dias seguidos ocorreu em 53,3% das vacas de terceira e de quarta a sexta lactações. A ingestão de dieta aniônica pré-parto com alto teor de cloreto provocou acidose hiperclorêmica e este desequilíbrio se reverteu no segundo dia pós-parto. Os efeitos induzidos sobre os equilíbrios eletrolítico e ácido base não foram capazes de prevenir a ocorrência de hipocalcemia subclínica nos primeiros dias da lactação.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Período de transição, eletrólitos séricos, cloreto de amônio, metabolismo do cálcio, cálcio sérico, bovinos leiteiros, dieta pré-parto.

**ABSTRACT.-** The objectives of the study were to evaluate the effects of the pre-partum anionic diet on the electrolyte balance and calcemia of high producing dairy cows in the first days of lactation, and to verify the impact on the frequency of subclinical hypocalcemia. Sixty healthy Holstein cows, producing 30 kg milk/day, handled in intensive system (compost barn), were distributed in groups (n=15) according to calving order: first, second, third, and fourth to sixth. In the last three weeks before calving they received a diet with negative DCAD (-6 mEq/100g MS) and high chloride content. After calving, they received a diet with positive DCAD (18 mEq/100g MS). Urine pH was measured before calving. Serum Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>, and total Ca concentrations, and SID<sub>3</sub> were determined in samples taken soon after

<sup>2</sup> Artigo formatado de acordo com as normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira. Disponível em: <<http://www.pvb.com.br/portal/normas>>

calving (0h), 24, 48, 72 and 96h after. The frequencies of subclinical hypocalcemia were determined considering the critical value of 8.5 mg/dL. Two-way repeated measures ANOVA and chi-square test were used for comparisons. The cows eliminated acidic urine before calving.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , and  $\text{SID}_3$  values did not differ between groups.  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  did not vary between days;  $\text{Cl}^-$  was elevated at calving and decreased until 72h; and  $\text{SID}_3$  was reduced at calving and increased up to 48h. The Ca levels were reduced until 24h and increased up to 72h. Cows of third and fourth to sixth lactations presented lower values up to 24h. Hypocalcemia was observed in almost half of the cows (43.3% to 55%) until 48h. The maintenance of hypocalcemia for three or more consecutive days occurred in 53.3% of third and fourth to sixth lactations cows. Ingestion of a high chloride prepartum anionic diet led to hyperchloremic acidosis and this imbalance was reversed on the second postpartum day. The induced effects on electrolyte and acid-base balances were not able to prevent the occurrence of subclinical hypocalcemia in the first days of lactation.

**INDEX TERMS:** Transition period, serum electrolytes, ammonium chloride, calcium metabolism, serum calcium, dairy cattle, prepartum diet.

## INTRODUÇÃO

As vacas leiteiras de produção elevada, notadamente aquelas com maior número de parições, têm dificuldade para manter a homeostase do cálcio nos dias iniciais da lactação por causa da perda súbita e excessiva pelo colostro e da resposta lenta e insuficiente dos mecanismos responsáveis pela manutenção da calcemia em valores fisiológicos (Oetzel 2013, Goff 2014). A queda resultante das concentrações sanguíneas de cálcio pode ser acentuada, determinando a paresia puerperal hipocalcêmica (PPH), doença também denominada de febre do leite ou hipocalcemia clínica, ou pode ser branda, caracterizando a hipocalcemia subclínica (Lean et al. 2013). A hipocalcemia subclínica possui frequência maior do que a PPH, podendo ocorrer em torno de 50% das vacas múltiparas recém-paridas (Reinhardt et al. 2011, Caixeta et al. 2015), e provoca prejuízo econômico muito maior porque está associada com o aparecimento de outras doenças no período de transição pós-parto (Kimura et al. 2006, DeGaris & Lean 2009, Martinez et al. 2012).

Dentre as medidas preventivas para a hipocalcemia, destaca-se a ingestão de dieta aniônica no período de transição pré-parto, ou seja, nas últimas três semanas de gestação. Este tipo de dieta possui valor reduzido para a diferença entre cátions e ânions na dieta (DCAD), calculada pela equação  $\text{DCAD} = (\text{Na} + \text{K}) - (\text{Cl} + \text{S})$ . Ao contrário da dieta convencional, na qual predominam os cátions, a dieta aniônica possui maior concentração de ânions e portanto, DCAD negativa (Constable 1999, 2014, DeGaris & Lean 2009). As vacas que ingerem dieta com DCAD baixa desenvolvem acidose metabólica e isto ativa os mecanismos responsáveis pela manutenção da calcemia num período em que a demanda metabólica de cálcio é

reduzida. A ativação prévia destes mecanismos permite que a vaca enfrente a demanda acentuada de cálcio no início da lactação de forma razoavelmente equilibrada (Goff 2008, 2014).

A oferta de dietas com DCAD reduzida no final da gestação vem sendo empregada há quatro décadas e é difundida amplamente, incluindo os rebanhos leiteiros brasileiros. A sua eficácia em reduzir a incidência de PPH é comprovada (Charbonneau et al. 2006, Lean et al. 2013, Hassan et al. 2018). No caso da hipocalcemia subclínica, estima-se que a ingestão da dieta aniônica possa diminuir pela metade a incidência desta condição (Goff 2008, Oetzel 2013), entretanto, faltam evidências científicas que sustentem esta afirmação.

A acidose metabólica decorrente da ingestão de dietas aniônicas está bem documentada nas vacas leiteiras (Joyce et al. 1997, Gelfert et al. 2007, 2010, Zimpel et al. 2018). Por outro lado, a influência deste tipo de dieta sobre a variação dos eletrólitos séricos antes e após o parto foi apresentada em uma única investigação científica (Grünberg et al. 2011). O presente estudo teve como objetivos avaliar os efeitos que a dieta aniônica pré-parto provoca sobre o equilíbrio eletrolítico e sobre a calcemia de vacas leiteiras de alta produção, primíparas e múltíparas, ao longo dos primeiros dias de lactação, e verificar o impacto sobre a frequência da hipocalcemia subclínica.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Animais e condições de alojamento*

O presente estudo foi realizado em uma propriedade leiteira no município de Toledo, Paraná (latitude 24° 42' 49" S, longitude 53° 44' 35" W e altitude média de 560m) entre novembro de 2017 e junho de 2018. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), registrado como o processo número 13822.2017.94.

Foram incluídas no estudo 60 fêmeas da raça Holandesa (HPB), clinicamente sadias, com produção média de 30 kg de leite/dia, pertencentes a uma única propriedade rural, onde permaneceram durante todo o período experimental. Os seguintes grupos, com 15 animais cada, foram compostos de acordo com a ordem de lactação: primeira, segunda, terceira, e quarta a sexta lactação. As vacas permaneceram em condição de manejo intensivo em instalações do tipo *compost barn* com sistema de ventilação eficiente e cama de maravalha. Aos 60 dias pré-parto, as fêmeas prenhes foram secas e alojadas em conjunto formando um lote único. Aos 21 dias pré-parto, as vacas foram realocadas formando um grupo próprio do período de transição, e permanecendo neste lote até o parto. Após o parto, os bezerros foram

imediatamente separados e as vacas foram transferidas para o lote de lactação. As ordenhas eram realizadas três vezes ao dia (5h00, 13h30 e 21h00) com uso de sistema convencional de ordenha mecânica. Nas vacas recém-paridas, a primeira ordenha do colostro foi realizada no próximo horário da rotina de ordenhas, ao término da ordenha das demais vacas. A maioria das vacas incluídas neste estudo pariu durante a noite e foi ordenhada no primeiro horário de ordenhas do dia.

Para a inclusão no estudo, as vacas deveriam apresentar escore de condição corporal (ECC) entre 3,0 e 3,5 e pH urinário com intervalo de 6,2 a 6,8, no período compreendendo as duas últimas semanas antes do parto. Partos distócicos ou auxiliados e gestação gemelar foram obedecidos como critérios de exclusão no estudo.

#### *Formulação e composição das dietas*

A dieta era oferecida aos animais duas vezes ao dia na forma de ração total misturada (RTM) e a água era disponível para consumo à vontade. As ofertas de RTM ocorriam às 8h00 e às 15h00. A dieta oferecida a partir dos 21 dias antes do parto foi formulada para atingir DCAD negativa e calculada para vacas de alta produção e peso estimado em 650 kg. A dieta oferecida a partir do parto foi calculada considerando-se o peso estimado de 580 kg, e a expectativa de que o leite produzido contivesse concentrações de 3,7% e 3% para gordura e proteínas, respectivamente. Amostra de cada tipo de dieta, aniônica no pré-parto e catiônica na lactação, foi colhida direto do cocho e submetida a análise bromatológica e de minerais. As características das dietas ofertadas antes e após o parto estão apresentadas no Quadro 1.

A DCAD foi calculada pela equação  $DCAD (mEq/100g MS) = [(Na^+ + K^+) - (Cl^- + S^{2-})]$ . A conversão para milésima parte do Equivalente (mEq), foi obtida a partir do peso atômico e da valência de cada cátion ou ânion, empregando-se a fórmula  $DCAD (mEq/100g MS) = [(\% Na^+/0,023 + \% K^+/0,039) - (\% Cl^-/0,0355 + \% S^{2-}/0,016)]$ , e considerando o percentual dos cátions e ânions na MS.

#### *Coleta de material e análises laboratoriais*

As determinações do ECC e do pH da urina foram realizadas uma única vez e no mesmo dia, entre sete e dez dias antes do parto. O ECC foi avaliado admitindo-se a escala de 1 a 5 (Edmonson et al. 1989). Para minimizar a subjetividade da avaliação, utilizou-se o aplicativo BCS Cowdition (Bayer Animal Health, Alemanha), disponível para *smartphones*. A coleta da urina foi realizada por micção induzida por massagem na vulva e no períneo e o

pH foi mensurado nas amostras recém obtidas utilizando-se aparelho portátil AK90 (AKSO; São Leopoldo, RS).

A produção individual de leite foi mensurada nos dias 20 e 21 de lactação, por meio de controladores de ordenha (Metatron 52, GEA Westfalia, Alemanha). O valor médio dos volumes de leite produzidos nos dois dias foi admitido como o valor de produção de cada vaca.

Amostras de sangue venoso foram coletadas em cinco momentos definidos: após o parto (logo após a primeira ordenha do colostro e no máximo até 5 horas após o parto), 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas depois. As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia coccígea com agulhas 21G (25 x 0,8 mm) do sistema de coleta a vácuo, utilizando-se frascos sem anticoagulante. O soro sanguíneo foi obtido por centrifugação após a retração do coágulo e conservado por congelamento (20°C negativos) até o momento das análises, realizadas, no máximo, até 10 meses após a coleta.

Para a determinação das concentrações séricas de Ca total empregou-se método colorimétrico e leitura espectrofotométrica (Dimension Xpand Plus<sup>®</sup>; Siemens; São Paulo, SP), utilizando-se reagente comercial específico (CA Flex<sup>®</sup> reagent cartridge; Siemens). As concentrações de sódio (Na<sup>+</sup>), potássio (K<sup>+</sup>) e cloretos (Cl<sup>-</sup>) foram mensuradas por método de eletrodo íon seletivo (RAPIDPoint 500 System; Siemens Healthcare Diagnostics Inc.; EUA). A diferença de íons fortes (*Strong Ion Difference* - SID<sub>3</sub>) foi calculada empregando-se a fórmula a seguir:  $SID_3 = (Na^+ + K^+) - (Cl^-)$  (Constable 2014).

**Quadro 1. Composição das dietas oferecidas nos períodos pré-parto e pós-parto, e valores recomendados pelo NRC (2001) para vacas leiteiras holandesas de alta produção**

	Pré-parto <sup>1</sup>		Pós-parto	
	(kg MS/d)	% MS	(kg MS/d)	% MS
<b>Ingredientes</b>				
silagem de milho	7,00	66,13	5,95	41,36
feno de Tifton	0,65	6,14	1,02	7,09
soja em grão tostada	-	-	0,64	4,43
farelo de milho	1,06	9,98	2,64	18,37
farelo de soja	0,88	8,33	1,86	12,93
soja extrusada 46%	-	-	0,72	4,98
casquinha de soja	0,46	4,32	0,48	3,34
Açúcar	-	-	0,24	1,67
gordura protegida	-	-	0,14	1,00
núcleo mineral aniônico <sup>1</sup>	0,50	4,72	-	-
adsorvente de micotoxinas <sup>2</sup>	0,04	0,38	0,03	0,21
núcleo mineral <sup>3</sup>	-	-	0,48	3,30
NaCl	-	-	0,04	0,24
Ureia	-	-	0,06	0,44
tamponantes <sup>4</sup>	-	-	0,09	0,60
<b>Composição química</b>				
Matéria seca (%)	44,56	Recomendado* 42,40	43,56	Recomendado* 53,20
Energia (Mcal/kg)	1,93	1,54 – 1,62	1,90	2,06
Proteína Bruta (%)	15,56	13,5 – 15,0	18,99	17,5
FDN (%)	37,00	25,0 – 33,0	39,58	25,0 – 33,0
FDA (%)	15,61	17,0 – 21,0	14,99	17,0 – 21,0
Extrato etéreo (%)	2,42	3,1	3,67	4,8 - 5,1
Ca (%)	0,72	0,40 – 0,44	0,68	0,74
P (%)	0,36	0,23 – 0,42	0,31	0,38
Mg (%)	0,35	0,40	0,22	0,27
K (%)	1,29	1,32 – 1,35	1,32	1,19
Na (%)	0,30	0,12 – 0,13	0,29	0,34
S (%)	0,26	0,20 – 0,40	0,17	0,20
Cl (%)	1,28	0,42 – 0,89	0,27	0,36
DCAD (mEq/100g MS)	-6,11		18,27	

<sup>1</sup> Núcleo Pré-parto Aniônico Salus (Salus; Santo Antônio da Posse, SP); <sup>2</sup> Safetox Plus<sup>®</sup> (Safeeds; Cascavel, PR); <sup>3</sup> Núcleo Salus Lactação (Salus; Santo Antônio da Posse, SP); <sup>4</sup> Rumox<sup>®</sup> (Safeeds; Cascavel, PR); \* Dietas formuladas de acordo com o NRC (2001) para vacas holandesas de alta produção com peso aproximado de 650 kg antes do parto e de 580 kg no início da lactação. <sup>1</sup> Tempo médio de consumo de 21 dias.

#### Análise estatística

A análise de variâncias unifatorial foi empregada para comparar a produção de leite e o pH da urina entre os grupos. Para as variáveis séricas estudadas (Ca total, eletrólitos e SID<sub>3</sub>) empregou-se a análise de variâncias de medidas repetidas bifatorial, testando-se o efeito do fator tempo (dias após o parto), o efeito do fator ordem de lactação e a interação entre os dois fatores. Quando a estatística F resultou significativa, o teste de Tukey foi empregado para comparação entre as médias.

O valor 8,5 mg/dL foi admitido como limítrofe para situação de equilíbrio da concentração de cálcio total no soro sanguíneo (Martinez et al. 2012, Oetzel 2013, Farnia et al. 2018). A distribuição de frequência de vacas com hipocalcemia foi estabelecida em cada um dos cinco primeiros dias de lactação, e em cada grupo individual, considerando a manutenção de hipocalcemia por dois ou mais dias consecutivos. O teste de qui-quadrado foi empregado para verificar se a ocorrência de hipocalcemia estava associada aos dias em lactação ou às ordens de lactação das vacas.

Relações entre as variáveis estudadas foram verificadas por meio do teste de correlação de Pearson. Para todos os métodos estatísticos empregados, admitiu-se a probabilidade de erro de 5%. O programa SigmaStat for Windows 3.1 foi usado para a realização da análise.

## RESULTADOS

As vacas estudadas apresentaram produção de  $30,99 \pm 7,32$  kg de leite ao término da terceira semana de lactação. De acordo com a ordem de parição, as médias de produção foram  $28,99 \pm 6,48$  kg,  $32,99 \pm 7,67$  kg,  $31,48 \pm 6,06$  kg e  $30,51 \pm 8,92$  kg de leite nas vacas de primeira, segunda, terceira e de quarta a sexta lactações, respectivamente, não havendo diferença entre os grupos ( $P=0,511$ ).

O pH da urina, mensurado 7 a 10 dias antes do parto, não diferiu entre os grupos ( $P=0,062$ ) e exibiu valor global de  $6,65 \pm 0,30$ . Os valores foram  $6,46 \pm 0,29$  nas vacas de primeira lactação,  $6,71 \pm 0,25$  nas de segunda,  $6,74 \pm 0,34$  nas de terceira e  $6,70 \pm 0,24$  nas vacas de quarta a sexta lactações.

Diferente da calcemia, as concentrações de eletrólitos séricos nos primeiros dias de lactação não foram influenciadas pela ordem de parição das vacas (Quadro 2). Considerando as variações entre os dias, por outro lado, as concentrações de  $\text{Na}^+$  e de  $\text{K}^+$  mantiveram-se sem diferença, enquanto a cloremia e a  $\text{SID}_3$  apresentaram comportamento inverso, com redução e elevação, respectivamente. A redução da cloremia se completou com 72 horas e a elevação da  $\text{SID}_3$  estava completa com 48 horas pós-parto.

A concentração sérica do Ca total diferiu tanto entre os grupos, quanto entre os primeiros dias de lactação, embora não tenha havido interação entre estes fatores (Quadro 2). A calcemia, menor ao parto e às 24 horas, elevou-se e manteve valores mais altos a partir das 72 horas de lactação. A influência dos grupos foi comprovada até 24 horas pós-parto e, a partir de 48 horas, a calcemia não mais diferiu entre as vacas de diferentes ordens de parição (Fig.1). Ao parto, vacas de primeira e de segunda lactação apresentaram valores mais altos do

que as vacas de quatro a seis lactações, e 24 horas pós-parto, vacas de primeira lactação tinham concentrações mais altas do que vacas de terceira lactação.

A hipocalcemia foi observada em praticamente metade das vacas até 48 horas após o parto (Quadro 3) e a frequência de vacas hipocalcêmicas diminuiu nos dias subsequentes ( $P=0,004$ ). O problema foi menos acentuado nas vacas com menor número de lactações, especialmente nas primeiras 48 horas de lactação. Considerando-se a manutenção da hipocalcemia por dois ou mais dias consecutivos, observou-se este tipo de ocorrência em 58,3% (35/60) das vacas, não havendo distinção entre os grupos ( $P=0,257$ ): 40% (6/15) nas novilhas, e 53,3% (8/15), 73,3% (11/15) e 66,7% (10/15) nas vacas de segunda, terceira e quarta a sexta lactações, respectivamente. Quando o período de manutenção da hipocalcemia foi estendido para três ou mais dias consecutivos, a ocorrência caiu para 31,7% (19/60) das vacas e a diferença entre os grupos tornou-se marcante ( $P=0,004$ ), com maior frequência nos grupos de terceira e de quarta a sexta lactações (53,3%; 8/15 em ambos) e menor frequência nas primíparas (6,7%; 1/15) e nas vacas de segunda lactação (13,3%; 2/15).

As concentrações de Ca sérico ao parto e às 24 horas de lactação não se correlacionaram com as de  $\text{Na}^+$  e as de  $\text{K}^+$ , e apresentaram correlação fraca com as de  $\text{Cl}^-$  ( $r=0,212$ ;  $P=0,02$ ) e com a  $\text{SID}_3$  ( $r=0,277$ ;  $P=0,002$ ).

**Quadro 2. Valores médios das concentrações de sódio ( $\text{Na}^+$ ), de potássio ( $\text{K}^+$ ), de cloretos ( $\text{Cl}^-$ ) e de cálcio total (Ca) e da diferença de íons fortes ( $\text{SID}_3$ ) no soro sanguíneo de vacas holandesas de alta produção nos cinco primeiros dias de lactação e que receberam dieta aniônica antes do parto. Efeitos da ordem de lactação e dos momentos após o parto, e interação entre os dois fatores**

	Parto	24 h	48 h	72 h	96 h	EPM <sup>§</sup>	Ordem* P	dpp <sup>†</sup> P	Interação P
$\text{Na}^+$ (mmol/L)	143,07	141,29	149,21	140,81	140,00	0,832	0,297	0,108	0,687
$\text{K}^+$ (mmol/L)	4,65	4,77	4,70	4,63	4,58	0,070	0,282	0,291	0,342
$\text{Cl}^-$ (mmol/L)	111,21 <sup>a</sup>	108,30 <sup>b</sup>	106,58 <sup>bc</sup>	105,96 <sup>c</sup>	105,33 <sup>c</sup>	0,513	0,229	<0,001	0,117
$\text{SID}_3$ (mmol/L)	36,51 <sup>b</sup>	37,76 <sup>ab</sup>	39,32 <sup>a</sup>	39,48 <sup>a</sup>	39,25 <sup>a</sup>	0,693	0,275	0,005	0,532
Ca (mg/dL)	8,22 <sup>b</sup>	8,26 <sup>b</sup>	8,51 <sup>ab</sup>	8,62 <sup>a</sup>	8,80 <sup>a</sup>	0,113	0,007	<0,001	0,396

<sup>§</sup> EPM: erro padrão da média; \* ordens de lactação: primeira lactação, segunda lactação, terceira lactação e quarta a sexta lactação (n=15 para cada grupo); <sup>†</sup> dpp: dias pós-parto; <sup>a,b,c</sup> letras diferentes na mesma linha representam diferença entre os momentos ( $p<0,05$ ).

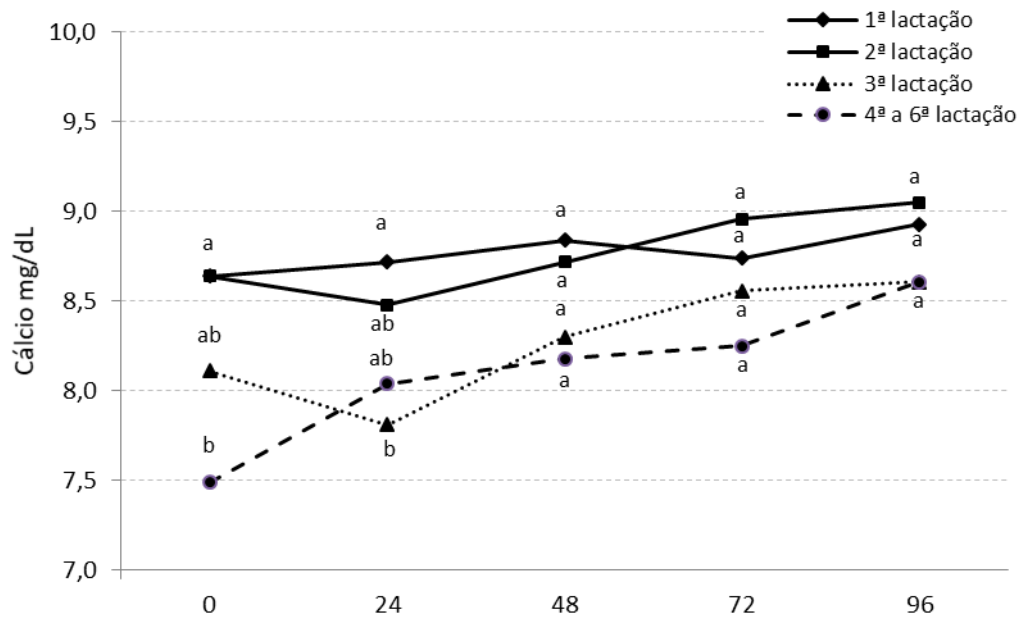


Figura 1. Variação da calcemia, nas primeiras 96 horas de lactação, de vacas holandesas de alta produção divididas de acordo com a ordem de lactação (n=15 cada) e que receberam dieta aniônica antes do parto.

**Quadro 3. Ocorrência de hipocalcemia (concentração de cálcio no soro sanguíneo < 8,5 mg/dL) em vacas holandesas de alta produção nos cinco primeiros dias de lactação e que receberam dieta aniônica antes do parto**

Lactação	Parto	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
1ª (n=15)	2	4	3	6	2
2ª (n=15)	5	9	6	4	3
3ª (n=15)	10	12	6	5	4
4ª a 6ª (n=15)	12	8	11	5	5
Total (n=60)	29 (48,3%)	33 (55%)	26 (43,3%)	20 (33,3%)	14 (23,3%)

## DISCUSSÃO

O valor crítico da concentração sérica de cálcio abaixo do qual se define a hipocalcemia subclínica é variável entre os autores. A concentração de 8,0 mg/dL foi classicamente admitida durante muito tempo (Goff 2008, DeGaris & Lean 2009, Reinhardt et al. 2011) e ainda é aceita (Goff 2014, Caixeta et al. 2015). Contudo, a partir do estudo de

Martinez et al. (2012), comprovando que concentrações séricas de cálcio abaixo de 8,6 mg/dL estavam relacionadas com diminuição da atividade de neutrófilos, o valor de 8,5 mg/dL passou a ser considerado crítico (Oetzel 2013, Farnia et al. 2018). Acompanhando a tendência mais atual, a hipocalcemia foi admitida, no presente estudo, como concentração inferior a 8,5 mg/dL.

Os percentuais de vacas hipocalcêmicas observados (Quadro 3) são coerentes com os apontados em levantamentos epidemiológicos realizados em rebanhos de vacas da raça HPB (Reinhardt et al. 2011, Caixeta et al. 2015). Isto indica que, com respeito à manutenção da calcemia nos primeiros dias de lactação, as vacas brasileiras de alta produção apresentam comportamento semelhante aos das vacas norte americanas. A dificuldade em manter a calcemia é mais acentuada em vacas com maior número de lactações (Reinhardt et al. 2011), especialmente nas primeiras 48 horas pós-parto (Caixeta et al. 2015). Conforme estimado por resultado de meta-análise, o risco de hipocalcemia é 9% maior a cada lactação subsequente (Lean et al. 2013).

Um resultado que merece destaque é o de que a hipocalcemia se manteve presente por dois ou mais dias consecutivos em número expressivo das vacas estudadas. Metade das vacas de terceira e de quarta a sexta lactações manteve-se hipocalcêmica por três ou mais dias seguidos, ao contrário das vacas mais jovens. Esta discrepância observada em relação às ordens de lactação caracteriza claramente que as vacas mais jovens foram capazes de recuperar o equilíbrio rapidamente, enquanto as mais velhas exibiram mais dificuldade para reverter o desequilíbrio metabólico. O aumento do risco de hipocalcemia com o avançar da idade pode ser explicado por diferentes motivos: diminuição do número de receptores para o calcitriol (vitamina D ativa) nos enterócitos, diminuição do número de osteoblastos e de osteoclastos ativos nos sítios de remodelamento ósseo, e, provavelmente, diminuição do número de receptores para o paratormônio (PTH) nas células renais (DeGaris & Lean 2009, Goff 2014). As respostas aos estímulos positivos para manutenção da calcemia (PTH e calcitriol) são, portanto, mais lentas e de magnitude inferior nas vacas de terceira ou mais lactações, destacando-se as capacidades menores de absorção intestinal de cálcio e de mobilização do cálcio ósseo.

No caso das vacas com três ou mais lactações estudadas a maior preocupação não se deve à magnitude da hipocalcemia em si, mas sim, à duração prolongada da mesma. Em valores médios, as vacas de terceira lactação corrigiram a calcemia 72 horas após o parto e as de quarta a sexta lactações somente 24 horas após isto (Fig.1). A curva de variação da concentração sérica de cálcio nas vacas mais velhas é compatível com a obtida por Kimura et

al. (2006) em vacas Jersey, comprovadamente mais susceptíveis do que as da raça HPB a desenvolverem hipocalcemia pós-parto (Goff 2014). As concentrações mais reduzidas de cálcio foram verificadas ao parto e 24 horas após e a concentração de 8,5 mg/dL somente foi alcançada com 96 horas de lactação (Kimura et al. 2006). A persistência de hipocalcemia subclínica durante os quatro primeiros dias de lactação pode aumentar o risco de as vacas mais velhas desenvolverem outras doenças relacionadas no período de transição pós-parto, gerando prejuízo econômico (Goff 2008, 2014, DeGaris & Lean 2009, Oetzel 2013). A ocorrência de doenças não foi avaliada nas vacas estudadas, mas a produção de leite não diferiu entre os grupos ao término da terceira semana de lactação.

Ainda que se considerasse o valor crítico de 8,0 mg/dL para a concentração de cálcio no soro sanguíneo, a prevalência continuaria elevada no início do período de observação: 35% das vacas ao parto, 40% às 24 horas, 20% às 48 horas, 16,7% às 72 horas e 13,3% às 96 horas pós-parto. Metade das vacas de terceira (8/15; 53,3%) e de quarta e sexta lactações (8/15; 53,3%) manteve hipocalcemia por dois ou mais dias consecutivos. A hipocalcemia subclínica deve ser entendida, portanto, como um problema relevante no rebanho estudado, e fica claro que a ingestão de dieta aniônica no período de transição pré-parto não contribuiu para prevenir o desequilíbrio.

A dieta ingerida nas três últimas semanas de gestação possui as características próprias de uma dieta do tipo aniônica. A DCAD é negativa (-6,11 mEq/100g MS) porque a concentração de cloreto é muito elevada (Quadro 1) e a soma dos ânions (Cl e S) supera a soma dos cátions (Na e K). O núcleo mineral aniônico utilizado na preparação da RTM continha NaCl e NH<sub>4</sub>Cl como fontes de cloreto e MgSO<sub>4</sub> como fonte principal de enxofre. Devido ao teor elevado marcante de cloreto na dieta, é correto afirmar, portanto, que o NH<sub>4</sub>Cl foi o sal aniônico principal ingerido pelas vacas. Após o parto, as vacas passaram a receber a dieta de lactação tipicamente catiônica (DCAD de 18,27 mEq/100g MS), com teor reduzido de cloreto devido a retirada do NH<sub>4</sub>Cl da composição.

Os efeitos da ingestão da dieta aniônica antes do parto e da mudança súbita para a dieta catiônica de lactação sobre o equilíbrio eletrolítico das vacas estudadas estão claramente demonstrados no Quadro 2. Enquanto as concentrações de Na<sup>+</sup> e de K<sup>+</sup> mantiveram-se inalteradas, a cloremia, elevada ao parto, reduziu-se rapidamente e a SID<sub>3</sub> plasmática, diminuída ao parto, se elevou. Isto comprova que a dieta aniônica provocou hiperclorêmia nas vacas e que o desequilíbrio eletrolítico foi prontamente revertido quando passaram a receber a dieta de lactação.

Embora o exame hemogasométrico não tenha sido realizado, é possível afirmar que as vacas estudadas desenvolveram o estado de acidose metabólica tomando-se como base o fato de eliminarem urina ácida (Constable et al. 2009). De acordo com a teoria dos íons fortes, a hiperclorêmia, determinando a diminuição da  $SID_3$  no plasma, é o desequilíbrio primário provocado pela dieta aniônica e a acidose metabólica se instala como consequência obrigatória (Constable 1999, 2014). Pode-se concluir, portanto, que a ingestão do suplemento aniônico rico em  $NH_4Cl$  provocou acidose hiperclorêmica nas vacas em final de gestação.

Estes mesmos tipos de desequilíbrios eletrolítico e ácido base foram comprovados em caprinos (Singh et al. 2007) e em ovinos (Ferreira et al. 2014) que ingeriram  $NH_4Cl$  com a finalidade de acidificação da urina para a prevenção de urolitíase. O excesso de cloreto ingerido provoca aumento da excreção fracionada urinária de cloretos (Stratton-Phelps & House 2004, Mavangira et al. 2010, Ferreira et al. 2018) e isto explica a redução do pH da urina, uma vez que a maior concentração de cloretos reduz a  $SID_3$  urinária (Constable et al. 2009). Outros estudos empregando ovinos comprovaram que a acidose hiperclorêmica ocorre também com a ingestão de outros tipos de sais aniônicos à base de cloretos, tais como,  $CaCl_2$  (Espino et al. 2003),  $HCl$  (Las et al. 2007) e  $MgCl_2$  (Wilkins et al. 2016).

As variações dos eletrólitos séricos em vacas recém-paridas que receberam dieta aniônica rica em cloreto no período de transição pré-parto foram apresentadas anteriormente em um único registro (Grünberg et al. 2011). Os resultados obtidos foram parecidos com os do presente estudo, porém, ao contrário das vacas estudadas, as concentrações séricas de  $Na^+$  se reduziram após o parto. A acidose metabólica hiperclorêmia também foi comprovada, assim como a acidificação da urina com aumento da excreção de  $Cl^-$ , e estes desequilíbrios foram rapidamente revertidos após o parto com a troca para a dieta de lactação contendo baixo teor de cloretos. Mais recentemente, os resultados obtidos por Zimpel et al. (2018) em vacas no final de gestação reforçam a evidência de que a acidose hiperclorêmica é, de fato, o desequilíbrio provocado pela dieta aniônica.

O efeito acidogênico da dieta aniônica é esperado e desejável para que ela possa exercer o seu papel de auxílio na manutenção da homeostase do cálcio nas vacas leiteiras de alta produção que iniciam a lactação (DeGaris & Lean 2009, Goff 2014). Dentre os mecanismos sugeridos, destaca-se, atualmente, a comprovação de que a acidose metabólica induz hipercalciúria por diminuir a reabsorção tubular de cálcio quando a urina é ácida (Gelfert et al. 2007, 2010, Grünberg et al. 2011, Farnia et al. 2018, Zimpel et al. 2018). A perda contínua de cálcio pela urina nas últimas semanas de gestação ativa os mecanismos envolvidos na manutenção da calcemia, e mediados pelo PTH e pelo calcitriol. Após o parto,

com a suspensão da ingestão da dieta aniônica a acidose metabólica é rapidamente revertida (Joyce et al. 1997), a urina volta a ser alcalina (Grünberg et al. 2011) e a eliminação de cálcio pela urina cessa prontamente (Farnia et al. 2018), contribuindo para elevar a concentração sanguínea de cálcio. A ativação prévia dos mecanismos de mobilização do cálcio ósseo, de síntese de calcitriol e de absorção intestinal ativa de cálcio, capacita a vaca mantida em dieta aniônica no período de transição pré-parto para responder de maneira eficiente ao grande desafio imposto pela perda súbita de cálcio para o colostro (Goff 2008, 2014).

A ingestão de dieta aniônica no final da gestação é comprovadamente eficaz para prevenir a ocorrência da paresia puerperal hipocalcêmica (PPH) (Joyce et al. 1997, Charbonneau et al. 2006, DeGaris & Lean 2009, Lean et al. 2013, Hassan et al. 2018), também chamada de hipocalcemia clínica, certamente porque evita que a queda da calcemia seja muito acentuada no início da lactação. A sua eficácia para reduzir a ocorrência de hipocalcemia subclínica é, no entanto, duvidosa (Joyce et al. 1997, Farnia et al. 2018). De fato, durante o período de execução do estudo a frequência de casos de PPH foi muito reduzida no rebanho (9/591; 1.5%). Os resultados obtidos indicam que o contrário deve ser admitido para o caso da hipocalcemia subclínica nas vacas recém-paridas. A capacidade da dieta aniônica de diminuir a frequência de hipocalcemia subclínica nos rebanhos leiteiros é um assunto relevante que precisa ser melhor investigado.

## **CONCLUSÃO**

Com base nos resultados observados pode-se concluir que a ingestão de dieta aniônica pré-parto com alto teor de cloreto de amônio não alterou a calcemia, no entanto, provocou acidose hiperclorêmica, desequilíbrio que se reverteu no segundo dia pós-parto. Estes efeitos sobre os equilíbrios eletrolítico e ácido base não previniram a ocorrência de hipocalcemia subclínica nos primeiros dias da lactação de vacas de alta produção leiteira.

## **REFERÊNCIAS**

- Caixeta L.S., Ospina P.A., Capel M.B. & Nydam D.V. 2015. The association of subclinical hypocalcemia, negative energy balance and disease with bodyweight change during the first 30 days post-partum in dairy cows milked with automatic milking systems. *Vet. J.* 204(2):150-156. <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.01.021>> <PMid:25819756>
- Charbonneau E., Pellerin D. & Oetzel G.R. 2006. Impact of lowering dietary cation-anion difference in nonlactating dairy cows: a meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 89(2):537-548. <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72116-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72116-6)> <PMid:16428622>

- Constable P.D. 1999. Clinical assessment of acid-base status: strong ion difference theory. *Vet. Clin. N. Am., Food Anim. Pract.* 15(3):447-471. <[http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30158-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30158-4)> <PMid:10573806>
- Constable P.D. 2014. Acid-base assessment: when and how to apply the Henderson-Hasselbalch equation and strong ion difference theory. *Vet. Clin. N. Am., Food Anim. Pract.* 30(2):295-316. <<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.03.001>> <PMid:24980723>
- Constable P.D., Gelfert C.C., Fürll M., Staufenbiel R. & Stämpfli H.R. 2009. Application of strong ion difference theory to urine and the relationship between urine pH and net acid excretion in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 70(7):915-925. <<http://dx.doi.org/10.2460/ajvr.70.7.915>> <PMid:19566478>
- DeGaris P.J. & Lean I.J. 2009. Milk fever in dairy cows: a review of pathophysiology and control principles. *Vet. J.* 176(1):58-69. <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.029>> <PMid:18329301>
- Edmonson A.J., Lean I.J., Weaver L.D., Farver T. & Webster G. 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72(1):68-78. <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79081-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79081-0)>
- Espino L., Guerrero F., Suarez M.L., Santamarina G., Goicoa A. & Fidalgo L.E. 2003. Long-term effects of dietary anion-cation balance on acid-base status and bone morphology in reproducing ewes. *J. Vet. Med. A.* 50(10):488-495. <<https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2004.00590.x>> <PMid:15157015>
- Farnia S.A., Rasooli A., Nouri M., Shahryari A., Bakhtiary M.K. & Constable P.D. 2018. Effect of postparturient oral calcium administration on serum total calcium concentration in Holstein cows fed diets of different dietary cation-anion difference in late gestation. *Res. Vet. Sci.* 117(2):118-124. <<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.11.017>> <PMid:29253737>
- Ferreira D.O.L., Santarosa B.P., Sacco S.R., Dias A., Amorim R.M., Chiacchio S.B., Lisbôa J.A.N. & Gonçalves R.C. 2014. Efeito da suplementação de cloreto de amônio sobre os equilíbrios eletrolítico e ácido-básico e o pH urinário de ovinos confinados. *Pesq. Vet. Bras.* 34(8):797-804. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2014000800016>>
- Ferreira D.O.L., Santarosa B.P., Sacco S.R., Pereira P.F.V., Camilo S.L.O., Lisbôa J.A.N. & Gonçalves R.C. 2018. Excreção fracionada urinária de sódio, potássio e cloreto em cordeiros suplementados com cloreto de amônio para prevenção de urolitíase. *Pesq. Vet. Bras.* 38(5):870-874. <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5396>>

- Gelfert C.C., Loeffler L.M., Frömer S., Engel M., Hartmann H., Männer K., Baumgartner W. & Staufenbiel R. 2007. The impact of dietary cation anion difference (DCAD) on the acid-base balance and calcium metabolism of non-lactating, non-pregnant dairy cows fed equal amounts of different anionic salts. *J. Dairy Res.* 74(3):311-322. <<https://doi.org/10.1017/S0022029907002439>> <PMid:17451620>
- Gelfert C.C., Loeffler L.M., Frömer S., Engel M., Männer K. & Staufenbiel R. 2010. Comparison of the impact of different anionic salts on the acid-base status and calcium metabolism in non-lactating, non-pregnant dairy cows. *Vet. J.* 185(3):305-309. <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.06.013>> <PMid:19709906>
- Goff J.P. 2008. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Vet. J.* 176(1):50-57. <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.020>> <PMid:18342555>
- Goff J.P. 2014. Calcium and magnesium disorders. *Vet. Clin. N. Am., Food Anim. Pract.* 30(2):359-381. <<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.04.003>> <PMid:24980727>
- Grünberg W., Donkin S.S. & Constable P.D. 2011. Periparturient effects of feeding a low dietary cation-anion difference diet on acid-base, calcium, and phosphorus homeostasis and on intravenous glucose tolerance test in high-producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94(2):727-745. <<https://doi.org/10.3168/jds.2010-3230>> <PMid:21257041>
- Hassan E.B., Nouri M., Vogrin S. & Pyman M. 2018. Can neutral dietary cation-anion difference (DCAD) decrease occurrence of clinical periparturient hypocalcaemia in dairy cattle? *Austr. Vet. J.* 96(7):269-273. <<https://doi.org/10.1111/avj.12712>> <PMid:29944750>
- Joyce P.W., Sanchez W.K. & Goff J.P. 1997. Effect of anionic salts in prepartum diets based on alfalfa. *J. Dairy Sci.* 80(11):2866-2875. <[http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76251-9](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76251-9)> <PMid:9406079>
- Kimura K., Reinhardt T.A. & Goff J.P. 2006. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89(7):2588-2595. <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72335-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72335-9)> <PMid:16772578>
- Las J.E., Odongo N.E., Lindinger M.I., AlZahal O., Shoveller A.K., Matthews J.C. & McBride B.W. 2007. Effects of dietary strong acid anion challenge on regulation of acid-base balance in sheep. *J. Anim. Sci.* 85(9):2222-2229. <<https://doi.org/10.2527/jas.2007-0036>> <PMid:17504956>

- Lean I.J., Van Saun R. & DeGaris P.J. 2013. Mineral and antioxidant management of transition dairy cows. *Vet. Clin. N. Am., Food Anim. Pract.* 29(2):367-386. <<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.03.004>> <PMid:23809896>
- Martinez N., Risco C.A., Lima F.S., Bisinptto R.S., Greco L.F., Ribeiro E.S., Maunsell F., Galvao K. & Santos J.E. 2012. Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *J. Dairy Sci.* 95(12):7158-7172. <<https://doi.org/10.3168/jds.2012-5812>> <PMid:23021755>
- Mavangira V., Cornish J.M. & Angelos J.A. 2010. Effect of ammonium chloride supplementation on urine pH and urinary fractional excretion of electrolytes in goats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 237(11):1299-1304. <<http://dx.doi.org/10.2460/javma.237.11.1299>> <PMid:21118016>
- National Research Council. 2001. *Nutritional Requirements of Dairy Cattle*. National Academy Press, Washington DC. 370p.
- Oetzel G.R. 2013. Oral calcium supplementation in peripartum dairy cows. *Vet. Clin. N. Am., Food Anim. Pract.* 29(3):447-455. <<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.03.006>> <PMid:23809900>
- Reinhardt T.A., Lippolis J.D., McCluskey B.J., Goff, J.P. & Horst R.L. 2011. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Vet. J.* 188(1):122-124. <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.025>> <PMid:20434377>
- Singh T., Amarpal A., Kinjavdekar P., Aithal H.P., Pawde A.M. & Pratap K. 2007. Blood acid-base and electrolyte changes following oral administration of ammonium chloride in goats suffering from obstructive urolithiasis. *Indian J. Anim. Sci.* 77(8):745-748.
- Stratton-Phelps M. & House J.K. 2004. Effect of a commercial anion dietary supplement on acid-base balance, urine volume, and urinary ion excretion in male goats fed oat or grass hay diets. *Am. J. Vet. Res.* 65(10):1391-1397. <<http://dx.doi.org/10.2460/ajvr.2004.65.1391>> <PMid:15524326>
- Wilkens M.R., Praechter C., Breves G. & Schröder B. 2016. Stimulating effects of a diet negative in dietary cation-anion difference on calcium absorption from the rumen in sheep. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 100(1):156-166. <<https://doi.org/10.1111/jpn.12296>> <PMid:25643625>
- Zimpel R., Poindexter M.B., Vieira-Neto A., Block E., Nelson C.D., Staples C.R., Thatcher W.W. & Santos J.E.P. 2018. Effect of dietary cation-anion difference on acid-base status

and dry matter intake in pregnant cows. *J. Dairy Sci.* 101(9):8461-8475.  
<<https://doi.org/10.3168/jds.2018-14748>> <PMid:29970257>

## 8 CONCLUSÕES

Apesar da alta ocorrência de hipocalcemia subclínica observada nos animais da propriedade estudada, a suplementação de formiato de cálcio oral, usado como estratégia na prevenção, ao parto e 24 horas após, não contribuiu para o aumento dos níveis de cálcio sérico e, conseqüentemente, não reduziu a incidência da hipocalcemia subclínica em vacas leiteiras de alta produção.

A medida profilática com o uso de suplementação oral de formiato de cálcio não provocou efeitos na prevenção de doenças no periparto, bem como nas concentrações séricas de magnésio, fósforo e outros metabólitos sanguíneos. O uso indiscriminado dessa estratégia preventiva em todos os animais do rebanho pode não ser vantajoso.

A ingestão de dieta aniônica no pré-parto foi capaz de alterar o equilíbrio eletrolítico, resultando em acidose hiperclorêmica que se reverteu no segundo dia pós-parto. O efeito induzido não preveniu a ocorrência de hipocalcemia subclínica nas vacas holandesas de alta produção recém-paridas.

Estudos futuros com ambas as estratégias de prevenção da hipocalcemia subclínica devem ser realizados com a finalidade de esclarecer a melhor forma de administração, bem como os ajustes a serem feitos de acordo com a estratificação de grupos de risco maior.

## 9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Esta tese aborda um tema contemporâneo e rotineiro de fazendas leiteiras, cabendo, em parte, ao âmbito acadêmico fazer uso dos seus conhecimentos e da sua capacidade de investigação científica para fornecer recursos que permitam esclarecer eventuais dúvidas de caráter prático e/ou científico neste campo de atuação. Portanto, tendo em vista algumas observações e limitações durante a condução do presente estudo, é possível sugerir alguns pontos para estudos futuros, que venham aprofundar e elucidar os efeitos da suplementação de cálcio oral visando a prevenção da hipocalcemia subclínica e das doenças do parto.

Em relação aos estudos relevantes, é necessário compreender melhor o efeito da administração do formiato de cálcio em vacas leiteiras de alta produção. Apesar dos poucos estudos já publicados com tal formulação relatarem seus efeitos sobre a raça holandesa, estudos com vacas Jersey e outros padrões genéticos também merecem atenção, uma vez que, as diferenças no metabolismo de cálcio já foram estabelecidos entre algumas raças e também devido à ampla distribuição dos diferentes grupos genéticos no país.

Como outra linha de investigação futura, sugere-se apresentar um delineamento onde será possível realizar as coletas de sangue para mensuração bioquímica em momentos diferentes dos que foram realizados neste estudo, podendo, assim, evidenciar a curva da calcemia no pré e pós-parto, demonstrando melhor o efeito do formiato de cálcio sobre tais parâmetros. Além disso, outros estudos envolvendo a mensuração do cálcio ionizado, poderá indicar a real situação da calcemia nos animais, uma vez que tal apresentação de Ca é a forma biologicamente ativa e prontamente utilizável pela vaca leiteira.

Quanto ao protocolo de administração do formiato de cálcio oral, o presente estudo optou por fornecer um protocolo diferente do preconizado pela empresa, devido principalmente à imprevisibilidade do dia do parto das vacas leiteiras e sua dificuldade de inclusão na rotina da fazenda, o que de fato, pode não ter representado o efeito esperado pela sua suplementação. Desse modo, em estudos futuros, mesmo ante a dificuldade de prever o dia e momento do parto, sugere-se procurar fornecer o produto de acordo com a orientação da empresa.

Outro ponto importante para investigação científica é a caracterização das doenças no pós-parto. Apesar do grupos delineados para o estudo demonstrarem uma visão global da situação da fazenda leiteira, o poder de teste para as doenças estudadas foi reduzido.

Acredita-se que, com um número maior de observações, ou seja, um maior número de animais num futuro estudo, seja possível avaliar o efeito do formiato de cálcio oral com maior acurácia. Por fim, devido ao maior desafio metabólico, sugerem-se estudos futuros agrupando os animais de acordo com o risco de desenvolvimento de hipocalcemia subclínica, como são os casos de animais com claudicação ou até mesmo de acordo com a produção média da lactação anterior.

Em suma, este trabalho de tese deve ser encarado como “ponto de partida” para o desenvolvimento de outros estudos que, nesta área, visem a aprofundar o conhecimento, especialmente por meio da utilização de outros grupos de animais bem como de outros métodos de investigação científica.

**ANEXOS**

## ANEXO A

## Aprovação do CEUA dos artigos A e B



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 105/2017

Londrina, 23 de Agosto de 2017.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o adendo ao projeto intitulado: "**Hipocalcemia subclínica em vacas leiteiras: influência da administração do cálcio oral e da ordem da lactação.**" protocolo CEUA nº13822.2017.94 sob a responsabilidade de **Júlio Augusto Naylor Lisbôa**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **22/08/2017**.

O objetivo é avaliar a ocorrência da hipocalcemia subclínica em vacas leiteiras de alta produção recém-paridas e a sua relação com a ordem de lactação, com o uso de cálcio oral e com a ocorrência de outras enfermidades. Grau invasividade=1

Vigência do Projeto	01/09/2017 a 31/12/2019
Espécie/linhagem	Bovino / Holandesa
Nº de animais	120
Peso/Idade	550kg / Adulta
Sexo	Fêmeas.
Origem	Rebanho mantido em uma Fazenda produtora de leite (que explora a produção em vacas da raça holandesa - HPB)
Amostras a serem coletadas	Sangue venoso, sangue periférico e urina

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes  
Coordenadora da CEUA/UEL

**Ilmo.(a) Sr.(a)**  
**Prof. (a) Dr (a). Júlio Augusto Naylor Lisbôa**  
Responsável pelo projeto  
Departamento DCV

C/C para o Hospital Veterinário do CCA  
C/C para a Chefia do Depto. do DCV  
C/C para a Direção de Centro do CCA