

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Prevalência de hipercetonémia no pós-parto e suas
implicações na atividade reprodutiva em vacas leiteiras**

Ana Isabel da Silva Mendonça

Orientador(a): Prof. Dra. Maria da Graça Cunha Antunes Lopes

Coorientador(a): Dra. Helena Isabel Pereira Azevedo Maia

Porto, 2021

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Prevalência de hipercetonémia no pós-parto e suas
implicações na atividade reprodutiva em vacas leiteiras**

Ana Isabel da Silva Mendonça

Orientador(a): Prof. Dra. Maria da Graça Cunha Antunes Lopes

Coorientador(a): Dra. Helena Isabel Pereira Azevedo Maia

Porto, 2021

RESUMO

O presente relatório, reporta as atividades e o estudo experimental realizados no âmbito do estágio curricular do mestrado integrado em medicina veterinária. Este estágio decorreu em regime ambulatorio em explorações de bovinos leiteiros na região de Entre-Douro-e-Minho. Durante 16 semanas acompanhei o trabalho desenvolvido pela Dra. Helena Maia no serviço de clínica, fertilidade e de gestão das explorações, podendo a casuística ser consultada na Tabela A1. Simultaneamente, recolheram-se dados para um trabalho experimental sobre hipercetonémia em vacas de leite. A cetose é uma patologia metabólica comum nas explorações visitadas, sendo característica do peri-parto e provocando prejuízos para o produtor devido aos custos inerentes ao tratamento e também à diminuição do desempenho produtivo e reprodutivo dos animais. Assim, delineou-se um trabalho experimental com o objetivo de estudar a prevalência da hipercetonémia no pós-parto (pp) e a sua relação com alguns parâmetros reprodutivos em vacas leiteiras. Para isso, 183 vacas de aptidão leiteira, com parto ocorrido entre 23/11/2020 e 23/01/2021, foram avaliadas individualmente em quatro momentos. O primeiro ocorreu sete dias antes do parto e fez-se avaliação da condição corporal (CC). No segundo, realizado aos 14-17 dias pp, fez-se avaliação da CC, mediram-se os níveis de beta-hidroxibutirato e realizou-se um exame clínico-genital com avaliação da secreção cérvico-vaginal, grau de involução uterina e identificação da presença de corpo lúteo (CL) nos ovários. Por fim, no terceiro (28-30 dias pp) e quarto (38-40 dias pp) momento, avaliou-se o grau de involução uterina e a presença de CL. Registou-se também, o intervalo Parto-1ªIA e respetivo diagnóstico de gestação. Por fim, procedeu-se à análise dos dados através da análise de componentes principais.

A prevalência de hipercetonémia foi aproximadamente de 20%. A correlação mais importante encontrada para os níveis de BHB foi com a variação de CC antes e depois do parto. Quanto às implicações de hipercetonémia na deterioração de parâmetros reprodutivos, ela verificou-se principalmente quando associada a outros fatores tais como patologias do peri-parto (uterina mais relevantes) e excesso de CC antes do parto.

PALAVRAS-CHAVE:

Balanço Energético Negativo; Cetose; Eficiência Reprodutiva; Hipercetonémia

AGRADECIMENTOS

Ao longo destes 6 anos de percurso académico, foram várias as pessoas que me acompanharam e me apoiaram. Gostaria de agradecer em primeiro lugar à professora Dra. Graça Lopes pela excelente orientação neste projeto, pelo seu empenho e dedicação ao longo destes 6 meses de trabalho árduo.

À Dra. Helena Maia por todo o conhecimento transmitido durante o período de estágio, pela sua paciência e dedicação a este projeto.

Ao Daniel Silva, pela sua amizade.

A todos os colegas e amigos, em especial à Anabela Cunha e à Raquel Pandeirada, por me terem acompanhado ao longo destes 6 anos e por estarem sempre presentes nos bons e maus momentos.

Ao meu namorado Fernando, por todo o amor.

À minha família, em especial meus pais, Fernando e Maria, e ao meu irmão Fernando Miguel, por todo o apoio que me deram e me tem dado ao longo desta caminhada.

Aos meus avós, Álvaro e Albertina, pelos ensinamentos transmitidos ao longo da vida e pelo seu carinho.

Sinto uma enorme gratidão por vos ter comigo e por me ajudarem a crescer pessoal e profissionalmente.

A todos vós,

Muito Obrigada!

ÍNDICE

Introdução.....	1
Parte I.Revisão Bibliográfica	1
1. Cetose	1
1.1 Etiologia e Patofisiologia.....	1
1.2 Classificação	3
1.3 Fatores de Risco.....	4
1.4 Epidemiologia.....	5
1.5 Diagnóstico	5
1.5.1 Diagnóstico em Campo e Laboratorial	6
1.6 Abordagem Preventiva e Terapêutica	7
2. Atividade Reprodutiva em Bovinos de Leite	8
2.1 Período Pós-Parto e Retoma da Atividade Ovária	8
2.2 Anestro Pós-parto e os seus Fatores Predisponentes.....	8
3. Impacto da Cetose na Eficiência Reprodutiva.....	10
Parte II. Estudo Experimental.....	11
1.Objetivos.....	11
2. Material e Métodos	11
2.1. Caracterização da Amostra.....	11
2.2 Desenho Experimental.....	12
2.3 Métodos:	12
2.3.1 Avaliação da Condição Corporal (CC)	13
2.3.2 Medição dos Valores Séricos de Beta-Hidroxibutirato (BHB).....	13
2.3.3 Exame Clínico Genital.....	14
2.3.3.1 Registo de Patologias no Peri-Parto (PPP)	14
2.3.3.2 Avaliação da Secreção Cérvico-Vaginal (SCV)	14
2.3.3.3 Avaliação da Involução Uterina (IU)	15
2.3.3.4 Avaliação do Reinício da Atividade Ovária (1ºCL).....	15
2.3.4 Intervalo entre parto e a 1ª inseminação (P-1ªIA)	15
2.3.5 Percentagem de Prenhez à 1ªIA.....	16
2.3.6 Percentagem de Vacas Destinadas para Refugo.....	16
2.3.7 Percentagem de Vacas Não Inseminadas (NI).....	16
2.4 Processamento de dados.....	16

3. Resultados	17
3.1 Análise Descritiva dos Dados	17
3.2 Análise de Componentes Principais (PCA)	18
3.3 Análise de Agrupamentos	19
4. Discussão	22
5. Conclusão	27
Referências	28

ABREVIATURAS

AGNE	Ácidos Gordos Não Esterificados
AGV	Ácidos Gordos Voláteis
BEN	Balanço Energético Negativo
BHB	Beta hidróxido butirato
CC	Condição Corporal
CCAP	Condição Corporal Antes do Parto
CCDP	Condição Corporal Depois do Parto
CL	Corpo Lúteo
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona libertadora de gonodotrofinas
IA	Inseminação Artificial
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina
IU	Involução Uterina
LH	Hormona luteinizante
P-1ºCL	Intervalo Parto1º Corpo Lúteo (avalia o retorno à atividade ovárica)
P-1ªIA	Intervalo Parto 1ª Inseminação Artificial
pp	Pós-Parto
PPP	Patologias do Peri-Parto
PTR	Palpação Transretal
PTV	Palpação Transvaginal
SCV	Secreção Cérvico-Vaginal
VCC	Variação da Condição Corporal

INTRODUÇÃO

O pós-parto (pp) é uma fase difícil para as vacas de aptidão leiteira pela tendência de desenvolvimento de patologias metabólicas e infecciosas [1]. Durante esse período, ocorrem alterações endócrinas e metabólicas, associadas ao balanço energético negativo (BEN), que surge a partir do momento em que as necessidades energéticas para a manutenção e produção de leite excedem a energia proveniente do alimento ingerido [2;3]

Nas semanas que antecedem o parto o crescimento fetal e o desenvolvimento da glândula mamária requerem um elevado aporte energético e vitamínico, mas na semana anterior ao parto a capacidade de ingestão de matéria seca diminui 30%, reduzindo a disponibilidade de glicose no organismo e podendo dar início a um BEN [4]. Se, após o parto e com o início da produção de leite, a ingestão de hidratos de carbono continua a ser insuficiente para manter o elevado gasto energético, o organismo vai desenvolver mecanismos fisiológicos de adaptação ao BEN, com o objetivo de poupar a glicose para órgãos vitais [2;3;4;5]. Simultaneamente, o organismo ativa outra forma de obtenção de energia, para auxiliar na manutenção e produção de leite, através da metabolização das reservas corporais [3]. Este mecanismo conduz à formação de ácidos gordos não esterificados (AGNE) que, podem ser utilizados pelos tecidos ou então serem captados pelo fígado onde podem ser convertidos em glicose (via gliconeogénese) ou em corpos cetónicos (via cetogénese) [3]. Quando os mecanismos de adaptação ao BEN são garantidos, os corpos cetónicos e os AGNE são diretamente utilizados pelos tecidos como substrato energético, não havendo acúmulo em circulação. Contudo, devido a vários fatores (nutrição, manejo, ambiente e patologias pós-parto) pode haver falhas no mecanismo adaptativo ao BEN podendo assim desencadear um quadro de cetose [2].

PARTE I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. CETOSE

A cetose é uma patologia metabólica, frequente no puerpério em vacas de leite, e que se caracteriza por elevados níveis de corpos cetónicos em circulação, causando efeitos tóxicos no organismo bem como danos hepáticos [6]. Em Portugal, a cetose continua a ser uma patologia metabólica diagnosticada em muitas explorações, apresentando um elevado impacto na produção leiteira. Os custos relativos a esta patologia são elevados, o que tem conduzido a um maior esforço por parte dos produtores para a melhoria de vários aspetos relacionados com o manejo das vacas no período de transição de forma a diminuir o BEN característico do peri-parto [7;8].

1.1 Etiologia e Patofisiologia

Para a produção de leite são necessárias grandes quantidades de glicose, estimando-se que consuma 60 a 85% da glicose disponível no organismo [9]. No entanto, algumas vacas durante este período, pelas variações hormonais e pelas limitadas dimensões do rúmen (antes do parto) tem menor capacidade de ingestão de matéria seca. Desta forma, os hidratos de carbono ingeridos são insuficientes para a manutenção do organismo e a produção de leite [4].

Os bovinos obtêm energia através das elevadas quantidades de proteína microbiana, das proteínas e hidratos de carbono ingeridos que escapam à degradação ruminal e principalmente, pela fermentação microbiana no rúmen, que dá origem a ácidos gordos voláteis (AGV) [3;4]. Os principais AGV sintetizados denominam-se ácido acético, ácido butírico e ácido propiónico. O ácido acético e o ácido butírico são cetogénicos, contribuem para um aumento das concentrações de Acetil-coA e são importantes para a síntese de gordura do leite [10;3]. O ácido propiónico é glicogénico, ou seja, é um precursor do oxaloacetato, que nas mitocôndrias dos hepatócitos participa no ciclo de krebs para síntese de glicose, pela via da gliconeogénese (Figura 1, **via A**) [11]. Esta via metabólica é responsável pela produção de 90% da glicose do organismo e desta, cerca de 50-60% provém do ácido propiónico [4]. As espécies de bactérias presentes no rúmen, a sua quantidade, assim como o tipo de forragem fornecido influenciam a proporção de AGV produzidos no rúmen [4].

Uma vez que, na vaca leiteira, a síntese de lactose é prioritária, a energia proveniente do ácido propiónico é utilizada principalmente na produção de leite, diminuindo a sua disponibilidade para os outros tecidos [3;11]. Desta forma, intensifica-se o BEN e o organismo é obrigado a mobilizar os depósitos de gordura corporais (adipócitos) para a síntese de energia [8]. Em situações de hipoglicémia os níveis de insulina diminuem e há um aumento do glucagon estimulando a gliconeogénese no fígado (Figura 1; **via A**) e a lipólise nos adipócitos [1;12;13]. Embora no fígado a gliconeogénese seja estimulada ao máximo, há compostos intermediários que são produzidos em quantidade limitada como é o caso do oxaloacetato, principalmente em situações de BEN, não tendo capacidade de incorporar toda a acetil-coA no ciclo de krebs ([3]. Desta forma, a acetil-coA é encaminhada para uma nova reação, que é também estimulada ao máximo (Figura 1; **via B alternativa**), resultando na produção de corpos cetónicos [3;13]. Os corpos cetónicos são um conjunto de compostos que inclui o acetato, o B-hidróxido-butirato (BHB) e o acetoacetato. Estes compostos são enviados para a corrente sanguínea para serem utilizados como fonte energética. Quando a produção de AGNE e corpos cetónicos ultrapassa a capacidade de utilização pelos tecidos, estes ficam acumulados atingindo concentrações séricas elevadas

e que, a partir de determinados níveis, podem conduzir ao aparecimento de sintomatologia de cetose [2;9].

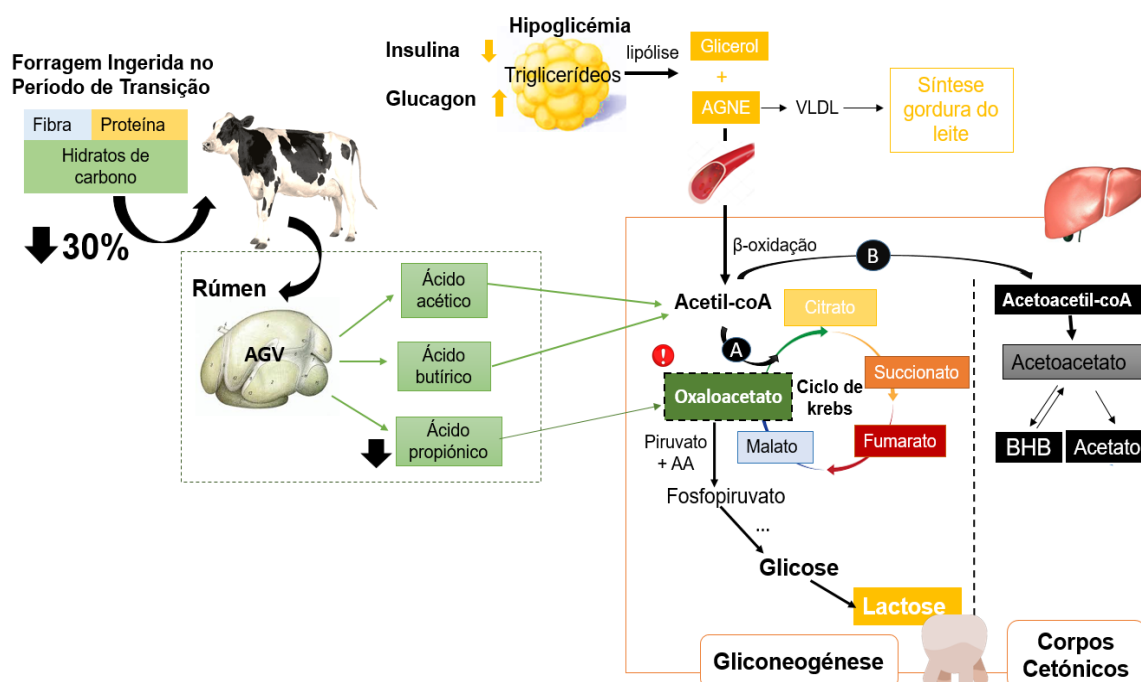


Figura 1: Metabolismo energético de uma vaca em produção com balanço energético negativo. Adaptado de [3].

1.2 Classificação

Com base na patogénese que lhe está subjacente, cetose pode ser classificada em cetose tipo I, tipo II e tipo III [14].

A cetose tipo I ou cetose primária, é o tipo de cetose mais comum, e ocorre predominantemente no período de 3-6 semanas pós-parto, próximo da altura do pico da produção de leite e, consequentemente, também do gasto de energia para esta finalidade [9]. Assim, sempre que, há alguma deficiência no manejo nutricional, os animais não conseguem responder a este aumento de necessidade de energia e entram em BEN. Como tal, a cetose de tipo I, está mais relacionada com um BEN intenso, que leva à falência dos mecanismos adaptativos ao BEN [2], tal como explicado no capítulo 1.1. Nestas condições, as concentrações de corpos cetónicos no sangue aumentam enquanto as concentrações de glicose no sangue baixam. Adicionalmente, neste tipo de cetose tipo I, a insulina é baixa devido a uma hipoglicemia crónica resultado da falta de precursores de glicose [9].

A cetose tipo II, também denominada de “lipidose hepática”, ocorre sobretudo nas duas primeiras semanas pp, e está geralmente associada a vacas com excessiva CC ao parto (>3,5). Vacas gordas estão em maior risco para este problema porque são mais propensas para diminuir a ingestão de matéria seca perto do parto, mas vacas mais magras também podem estar em risco se o manejo nutricional durante o peri-parto não for

adequado [5,14]. Assim, todas as vacas que desenvolvem BEN e comecem a mobilizar a gordura corporal antes ou no momento do parto podem desenvolver cetose do tipo II [9]. Estes animais, além de apresentarem níveis elevados de corpos cetônicos no sangue, também têm concentrações elevadas de insulina no sangue e as concentrações de glicose no sangue também estão altas, embora provavelmente apenas transitoriamente [9]. Neste tipo de cetose, a gliconeogénese e a cetogénese são limitadas e sempre que ocorrem períodos de anorexia, muitos AGNE são captados pelo fígado onde sofrem re-esterificação e se acumulam sobre a forma de triglicerídeos e dando origem a “lipidose hepática” [9]. Esta condição, juntamente com o BEN, além de prejudicar a gliconeogénese também deprime o sistema imunológico o que segundo alguns autores, pode justificar a associação deste tipo de cetose com outras patologias, em particular infecciosas tais como metrites e mamites [6;9].

Por fim, o aparecimento de cetose tipo III, está particularmente associada a uma alimentação rica em corpos cetônicos ou seus precursores, como é o caso, por exemplo, as silagens mal conservadas e ricas em ácido butírico [9;14].

Independentemente dos fatores etiológicos associados, as manifestações clínicas de cetose vão depender do nível de corpos cetônicos em circulação, da hipoglicemia e das alterações hepáticas [9]. Assim, também se considera que há duas formas de apresentação desta patologia: a cetose subclínica e a cetose clínica. A cetose subclínica caracteriza-se por um aumento da concentração de corpos cetônicos, sem os animais apresentarem sintomatologia evidente [8;9]. Geralmente, os níveis de BHB na cetose subclínica, encontram-se, de acordo com a maioria da bibliografia consultada, entre 1,2 e 2,9 mmol/L, havendo, contudo, alguma variação entre estudos [6]. Na cetose clínica, os animais apresentam uma diminuição do apetite e da quantidade de matéria seca ingerida, com diminuição da condição corporal e decréscimo da produção de leite (forma digestiva) [6]. A cetose clínica pode ainda surgir com sinais neurológicos quando os corpos cetônicos ultrapassam a barreira hematoencefálica com ação tóxica sobre o sistema nervoso central, mas é uma síndrome menos frequente [8]. No caso da cetose clínica, o limiar de concentração de BHB séricos que lhe está associado, também não é consensual, contudo na maioria da bibliografia consultada estava definido em 3mmol/L [6;15].

1.3 Fatores de Risco

Numerosos fatores contribuem para o desenvolvimento de cetose e no quadro B1 estão registados alguns dos mais importantes a ter em conta.

Dois destes fatores são a condição corporal e a duração do período seco. Geralmente, uma pontuação de CC ao parto superior a 3,25 (escala de 1-5) está associado

a um maior risco de desenvolvimento de cetose [5]. Além disso, alguns estudos também sugerem uma correlação direta entre a variação da CC antes e depois do parto e o risco de cetose [16]. Quanto ao período seco, alguns estudos encontraram um aumento do risco de cetose em animais que têm um período de seca maior [17]. Do mesmo modo, também um maior número de lactações e nível de produção de leite parecem aumentar o risco de desenvolvimento de cetose [6;8].

Adicionalmente, muitos outros fatores de manejo podem afetar o risco de cetose, como por exemplo o manejo nutricional da vaca no período de transição, a existência de parques pré-parto, a densidade de animais e outros [9]

1.4 Epidemiologia

A cetose é uma patologia frequentemente encontrada em ruminantes, em que mais de 90% dos casos ocorrem nos primeiros dois meses pp [18]. Segundo Suther et al [7], a prevalência de cetose clínica e subclínica em 10 países europeus foi em média 3,7 e 21,8%, respetivamente. Portugal registou uma prevalência de cetose clínica de 6,6% e de cetose subclínica de 29,5% [7]. Segundo alguns autores, 40% dos animais apresentam cetose subclínica pelo menos uma vez durante o período de lactação, enquanto a cetose clínica afeta em média apenas 5% do efetivo em produção [12]. A cetose subclínica também pode evoluir para cetose clínica, representando cerca de 20-30% desses casos [8]. A prevalência de cetose, dependendo do tipo de alimentação e do manejo existente em cada exploração, pode ter uma variação de cerca de 12% [8].

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico de cetose é geralmente baseado na epidemiologia, história clínica, anamnese e nos sinais clínicos expressos pelo animal no momento da avaliação [14]. Enquanto a cetose clínica pode ser diagnosticada com base na história clínica e na observação dos sinais clínicos, tal como já referidos no capítulo 1.3, no caso de cetose subclínica, por não apresentar sinais clínicos característicos, tem sido importante o desenvolvimento de análises bioquímicas e testes de doseamento de corpos cetónicos para auxiliar no diagnóstico dessa complexa patologia [6;12]. Esta medição de corpos cetónicos pode ser realizada em campo ou no laboratório, podendo utilizar-se para a medição sangue, leite ou urina [8]. Foi demonstrado que análises ao sangue correspondem a menor fonte de erro em comparação com análises efetuadas ao leite e à urina, pois estas estão dependentes não apenas da concentração de corpos cetónicos no sangue, mas também da quantidade de leite produzido e da excreção de urina [8]. Dos corpos cetónicos apresentados, o BHB é o mais estável na circulação sanguínea e o que está em maior

quantidade, sendo considerado o teste “gold standard”, e por isso o mais avaliado em testes de diagnóstico [6;7].

1.5.1 Diagnóstico em Campo e Laboratorial

Os testes realizados em campo são mais económicos e proporcionam resultados fiáveis e imediatos [8;12]. A amostra de sangue pode ser recolhida tanto na veia jugular como na coccígea, evitando a veia mamária pelo facto de os valores da concentração de corpos cetónicos serem inferiores aos retratados por outros locais de colheita [19]. A concentração de BHB é medida por um dispositivo eletroquímico (Figura 2) a que se acoplam tiras de teste, e onde depois se coloca uma gota de sangue [20]. É um método de monitorização de cetose que garante elevada sensibilidade e especificidade [12;15]. Concentrações séricas de BHB $\geq 1,2$ mmol/L e < 3 mmol/L são usualmente indicativas de cetose subclínica. Uma concentração sérica de BHB ≥ 3 mmol /L está frequentemente associada a cetose clínica [6;15].

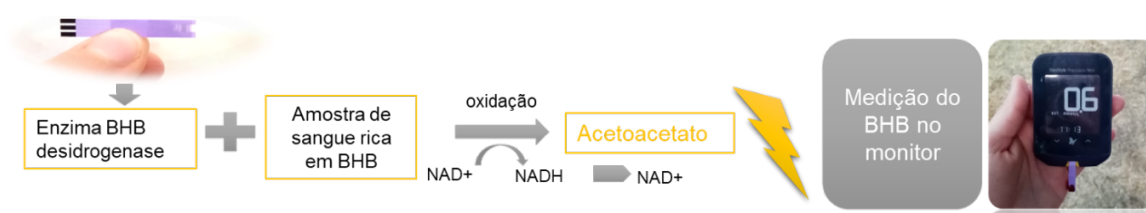


Figura 2: Detecção de BHB em amostras de sangue através de dispositivos de medição eletroquímicos Adaptado de [20].

A concentração de BHB poderá também ser medida através de amostras de leite, com auxílio de tiras reagentes, como o *keto-test* (Laboratório *Elanco*; Figura B1). O fundamento do teste é semelhante ao anterior, embora neste ocorra mudança de cor quando na presença de valores de BHB. A cor obtida deve ser comparada com a tabela de cores presente na embalagem, sendo uma determinação semi-quantitativa [21].

Para a deteção de corpos cetónicos na urina há disponíveis comercialmente tiras reagentes (*Multistix* do laboratório *Bayer*) contendo nitropussionato de sódio [8]. O nitropussionato de sódio ao reagir com o acetoacetato presente na urina, forma em meio alcalino uma cor púrpura que é avaliada segundo vários graus de intensidade de cor tal como no teste anterior, apresentando elevada sensibilidade e baixa especificidade para determinar cetose subclínica [8]. A prevalência de cetose subclínica em explorações também pode ser avaliada pela razão gordura/ proteína do leite. Em situações de BEN intenso, a gordura do leite aumenta e a percentagem em proteína diminui devido à redução da taxa de ingestão. Sempre que a razão de gordura/proteína for superior a 1,5 há uma forte correlação de existir cetose subclínica no efetivo testado [12].

Em laboratório, os métodos de eleição para avaliar os níveis de corpos cetônicos são a espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier, catálise enzimática, ressonância magnética nuclear, cromatografia líquida e fluorometria [12]. No quadro B2 estão registradas as principais características de cada método laboratorial.

1.6 Abordagem Preventiva e Terapêutica

A prevenção da cetose, em vacas leiteiras, deve ser feita tendo em consideração dos fatores de risco associados a esta patologia, mas de uma forma geral, pode-se considerar que um fator fundamental a ter em consideração é o manejo nutricional durante o período de transição [8;14;18].

A CC das vacas no final da lactação deve ser controlada por forma a evitar o aparecimento de animais com CC excessivas ($CC \geq 3,5$), pois são animais com maior predisposição para desordens metabólicas, como é o caso da hipercetonémia [5]. Da mesma forma, a variação da condição corporal (VCC) no pp não deve ser ≥ 0.5 pontos de forma a não produzir os efeitos negativos que o BEN exerce sobre alguns parâmetros reprodutivos [22].

Outra área crítica para prevenção da cetose é manter e promover o consumo de ração, pois as vacas tendem a reduzir o seu consumo nas últimas 3 semanas de gestação. A introdução na dieta de concentrado nas semanas que antecedem o parto, também deve ser progressivo de forma a garantir uma adaptação gradual da flora ruminal/gastrointestinal à dieta pp com vista a minimizar o BEN e a fortalecer o sistema imunitário. [18]

Podem ainda ser utilizados alguns para prevenção de cetose alguns aditivos nas rações. Por exemplo, o fornecimento de melaço e de aminoácidos essenciais protegidos da ação ruminal (niacina, metionina e colina) que parecem contribuir para o bom funcionamento hepático [23]. A administração por via oral de ionóforo de monensina 3, semanas antes do parto também parece contribuir para a diminuição dos casos de cetose subclínica, segundo alguns autores [8;23].

Adicionalmente, a seleção de linhagens genéticas com curvas de lactação persistente e com alta capacidade de ingestão, poderá também, mas a longo prazo, traduzir-se, na diminuição de incidência de cetose subclínica nas explorações [18]

Relativamente ao tratamento da cetose, ele é fundamentado na necessidade de restabelecimento da glicémia normal e em reduzir as concentrações séricas de corpos cetônicos. Um tratamento consiste em administrações IV de soluções de dextrose. Este geralmente resulta numa recuperação rápida do animal, mas frequentemente tem apenas um efeito transitório, sendo comum ocorrerem recaídas [14]. Nesse sentido, a combinação

da administração de dextrose com glicocorticóides IM (dexametasona) e protetores hepáticos (aminoácidos essenciais) pode resultar numa resposta mais sustentada, podendo ser repetida diariamente se necessário por vários dias (3-4 dias) [8;14]. Outro tratamento eficaz, e bem documentado, como terapia de cetose é a administração, por via oral, de propilenoglicol que atua como precursor de glicose e permite manter a glicemia e os níveis de insulina elevados, importantes para o normal funcionamento hepático [8;14].

2. ATIVIDADE REPRODUTIVA EM BOVINOS DE LEITE

2.1 Período Pós-Parto e Retoma da Atividade Ovária

Após o parto, inicia-se o processo de involução uterina que geralmente está completo por volta das seis semanas. Durante esse período, também o eixo hipotálamo-hipófise retoma a secreção hormonal cíclica, estimulando nos ovários a emergência, o desvio, a dominância e a ovulação de folículos, bem como a retoma da ciclicidade ovária [14;24]. Em condições fisiológicas, a secreção de FSH começa a aumentar ao 3º-5º dia pp, emergindo a primeira onda de crescimento folicular enquanto a retoma da síntese de LH se inicia às 2-3 semanas pp. Assim, a primeira ovulação pós-parto tende a ocorrer durante as seis primeiras semanas pp em cerca de 30-80% das vacas leiteiras [22;24]. De referir, que geralmente esta primeira ovulação pp não é acompanhada de manifestação de cio [22;24].

2.2 Anestro Pós-Parto e os seus Fatores Predisponentes

O anestro define-se por um período de ausência de atividade cíclica, devendo distinguir-se o anestro “comportamental” e o anestro “verdadeiro”. O anestro “comportamental” ou “sub-estro”, define-se por um período em que ocorre atividade ovária cíclica mas não é acompanhado por manifestações comportamentais de cio [24]. No anestro pp “verdadeiro”/“patológico”, não há atividade ovária cíclica e, esta aciclicidade, pode ser classificada com base na dinâmica folicular e luteica presente em diferentes tipos de anestro (tipo I, II, III e IV), cujas principais características são indicadas na tabela C1 [24].

No período pp, o BEN pode ser estimado através da avaliação da CC. A avaliação da CC é fundamental para averiguar o estado de saúde e manejo nutricional de bovinos de alta produção e é feita de forma qualitativa pela escala de condição corporal (Figura D1) sendo um critério subjetivo aceite internacionalmente [25;26]. Segundo Bisla et al., [26] e Walsh et al. [26], a CC pode estar relacionada com o desempenho reprodutivo. As vacas que ao parto surgem com $CC < 2,75$ ou que pelo contrário, apresentem $CC > 3,25$ com uma perda acentuada da CC no período pp, a quantidade de folículos presentes, o tamanho e crescimento do folículo dominante estão reduzidos. Com a diminuição da CC das vacas

leiteiras, no pp, a energia e nutrientes essenciais são encaminhados para órgãos cuja necessidade energética é superior, diminuindo o fornecimento energético aos ovários [24]. O BEN também conduz à diminuição da expressão dos recetores da hormona de crescimento no fígado e por este motivo, a síntese do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) é reduzida [27]. O IGF-I desempenha um papel fundamental no crescimento dos folículos justificando também a limitação do crescimento folicular nesse período [24]. Quando o crescimento do folículo dominante está reduzido, a produção de estrogénios e a amplitude e frequência dos pulsos de LH também diminuem, com inevitável impacto numa menor expressão de cio e consequentemente no menor sucesso da inseminação artificial [24;25;26].

No período pp, um manejo nutricional cuidado é imprescindível para combater o BEN marcado, sobretudo em bovinos de alta performance produtiva. Ao fornecer aos animais uma dieta pobre em energia e nutrientes, o BEN intensifica-se, diminuindo rapidamente a CC [25]. O BEN exerce um efeito negativo sobre o reinício da atividade folicular, limitando o crescimento bem como o tamanho dos folículos, aumentando o período de anestro [24]. Quando a dieta fornecida aos animais é mais rica em concentrado (sobretudo para colmatar o défice energético responsável pelo desenvolvimento de doenças no peri-parto), há um incremento do metabolismo dos esteroides por aumentar a perfusão hepática. Posto isto, ocorre a diminuição da concentração plasmática dos estrogénios e de progesterona, explicando o facto de vacas em alta produção e com elevados consumos de concentrado apresentarem folículos que não ovulam, ou anestros comportamentais [26].

No verão, o *stress* térmico reduz o apetite que consequentemente poderá ainda agravar a perda de CC no período pp [26]. Além deste efeito indireto, o *stress* térmico também parece ter um efeito mais negativo sobre o reinício da atividade folicular, uma vez que é gerado um feedback negativo no eixo hipotálamo-hipófise, atrasando o retorno à ciclicidade [25].

A presença de patologias no peri-parto (metrite, mamite, claudicação, etc) também está implicada no atraso no retorno à ciclicidade ovária. Vacas em BEN no período pp, apresentam grau de imunossupressão que aumenta o risco de desenvolvimento de patologias [25]. A contaminação bacteriana do útero no após o parto é normal e inevitável, sendo que a grande maioria das vacas consegue controlar a infeção sem desenvolver metrites. No entanto 20% das vacas no pp acabam por desenvolver patologias uterinas [26]. Alguns autores, sugerem que a resposta inflamatória decorrida de infeções uterinas podem suprimir a libertação de hormonas gonodotróficas do eixo hipotálamo-hipófise. Desta forma, a libertação de FSH e LH ficaria comprometida e a retoma à ciclicidade

ovária atrasaria [24;26]. Por outro lado, as mamites clínicas quando surgem nos primeiros 28 dias pp também parecem condicionar o retorno à ciclicidade [25]. Por fim, as claudicações no período pp das vacas leiteiras parecem também estar associadas com períodos de anestro pp mais prolongados, sendo que várias hipóteses foram sugeridas para explicar este efeito [25].

3. IMPACTO DA CETOSE NA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA

Existem opiniões controversas quanto ao efeito da cetose na eficiência reprodutiva [6]. No estudo de Rutherford et al. [28] a cetose subclínica nas primeiras duas semanas pp reduz a duração e o pico de atividade (cio), aumenta os intervalos P-1ºcio, P-1ºIA e a taxa de concepção ao primeiro serviço em comparação com animais saudáveis. Pelo contrário, segundo McArt et al. [29] a taxa de concepção ao primeiro serviço não mostrou diferenças significativas entre os dois grupos de animais. Muito embora a literatura disponível seja muito concordante em relatar que a concentração elevada de BHB no sangue é prejudicial ao desempenho reprodutivo [6], Ospina et al. [30] destacou que a concentração de AGNE é um indicador mais forte de diminuição da eficiência reprodutiva do que o BHB. A forte associação entre os elevados níveis de AGNE e a diminuição eficiência reprodutiva deve-se à relação mais direta entre os AGNE e o BEN, em termos fisiológicos. Em situação de BEN, há hipoglicémia que de forma direta aumenta os níveis de glucagon e diminui os níveis de insulina, aumentando a lipólise dos triglicerídeos e consequentemente os níveis de AGNE. Embora as concentrações de BHB também estejam relacionadas ao BEN, a relação não é direta, sendo regulada por vários fatores [30].

Quer seja pela variação da CC, BEN ou pela influência das concentrações séricas de AGNE ou de corpos cetônicos, a maioria dos estudos apontam que a redução da eficiência reprodutiva tem um impacto significativo nas explorações leiteiras. Assim, no capítulo seguinte, é apresentado o trabalho realizado durante o estágio curricular, no qual foram recolhidos dados de 183 vacas de aptidão leiteira, que iniciaram a produção de leite no período compreendido entre 23/11/2020 e 23/01/2021, por forma a averiguar, a prevalência da hipercetonémia no aos 14-17 dias pp e a sua relação com alguns parâmetros reprodutivos em vacas leiteiras. Adicionalmente, foram também estudadas, para esta amostra, as correlações entre hipercetonémia e alguns dos fatores de risco associados com cetose e aciclicidade pp.

PARTE II. ESTUDO EXPERIMENTAL

1.OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo é o de avaliar o impacto de hipercetonémia aos 14-17 dias pp na performance reprodutiva em bovinos de leite em explorações da região de Entre-Douro-e-Minho.

Quanto aos objetivos específicos do trabalho experimental eles consistiram em:

- Determinar a prevalência de hipercetonémia em vacas de leite primíparas e múltíparas (2 ou mais partos) aos 14-17 dias pp;
- Determinar a associação entre hipercetonémia e:
 - Paridade;
 - CC antes do parto (7 dias), depois do parto (14-17 dias) e sua diferença;
 - Ocorrência de patologias do peri-parto (até 14-17 dias pp);
 - Grau de involução uterina (aos 14-17 dias pp);
 - Pontuação da secreção vaginal (aos 14-17 dias pp);
 - Reinício da atividade ovárica (1º CL pp) e intervalo entre parto e a 1ªIA;
- Avaliar o impacto da hipercetonémia na percentagem da prenhez à 1ªIA e de refugo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Caracterização da Amostra

Neste estudo, foi feita uma seleção aleatória de 183 vacas de aptidão leiteira, que iniciaram a produção de leite no período compreendido entre 23/11/2020 e 23/01/2021. Os animais pertenciam a oito explorações agropecuárias da região de Entre-Douro-e-Minho. As explorações apresentavam semelhanças no que diz respeito ao clima, ao tipo de estabulação, período voluntário de espera (PVE=50-60 dias pp), período de secagem (≤ 60 dias), número de ordenhas diárias (2) e à distribuição diária de alimento. Todos os animais tinham à disposição água *ad libitum* e alimento de qualidade, podendo alimentar-se livremente a qualquer hora do dia. Nas oito vacarias do estudo, a alimentação era feita e distribuída pelo *unifeed*, permitindo uma mistura homogénea das matérias-primas e impedindo a seleção de alimento pelo animal. Contudo, os constituintes da mistura bem como a quantidade de matérias-primas adicionadas ao *unifeed* variam entre explorações e as fórmulas adotadas em cada exploração são da competência do acompanhamento nutricional feito geralmente por zootécnicos. Ao lote de animais que estão no pré-parto e na maternidade é fornecido o mesmo alimento das vacas em lactação, de forma a se preparem para o parto. No que diz respeito à dimensão da vacaria e a algumas atividades de manejo havia diferenças entre as explorações, tal como indicado na Tabela 1. De referir

em particular, que 59 dos 183 animais amostrados foram sujeitos a protocolos preventivos de cetose, e estes animais pertenciam às explorações indicadas na Tabela 1 embora o número de animais tratados por exploração fosse muito variável.

Tabela 1: Variações de manejo e infraestruturas entre as explorações amostradas.

Exploração	A	B	C	D	E	F	G	H
Animais em produção	120	90	80	150	57	70	60	60
Boxes de suplementação	não	sim	não	não	sim	sim	não	não
Parque pré-parto	sim	sim	sim	não	não	não	não	não
Maternidade	sim	sim	sim	sim	sim	não	não	sim

2.2 Desenho Experimental

O estudo decorreu entre 23/11/2020 e 15/03/2021, tendo uma duração total de 16 semanas. Durante este período, cada animal foi avaliado em quatro momentos distintos, como indicado na Figura 3. O primeiro momento de avaliação ocorreu aos sete dias antes da data prevista de parto, e foi feito o registo da identificação do animal, da paridade e foi avaliada a Condição Corporal (CCAP). O segundo momento de avaliação, teve lugar entre os dias 14 e 17 pp, altura em que foi novamente avaliada a CC (CCDP), foi determinado o valor sérico de BHB e realizado um exame clínico-genital. O exame clínico-genital consistiu na avaliação da secreção cérvico-vaginal (SCV) da involução uterina (IU) e da retoma da atividade ovárica cíclica (1ºCL). Por fim, no terceiro e no quarto momento de foram realizadas novamente a avaliação da IU e da presença do 1º CL. Após o último momento de avaliação, os registos de cada vacaria foram consultados por forma a obter a data da 1ªIA bem como, passados cerca de 30 dias desta data, o resultado do diagnóstico de gestação.

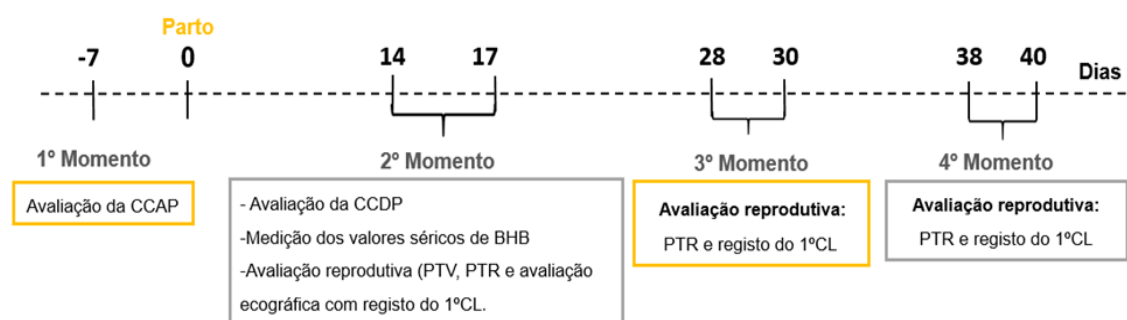


Figura 3: Esquema cronológico dos momentos de avaliação. **PTV**- Palpação transvaginal; **PTR**- Palpação transretal; **1ºCL**-1º Corpo lúteo **CCAP**- Condição corporal antes do parto; **CCDP**- Condição corporal depois do parto.

2.3 Métodos:

Em cada exploração foi deixada uma folha de registos, onde se anotou a data do parto e, no caso de haver, as patologias no peri-parto. Nos quatro momentos de avaliação,

foram registados todos os dados referentes aos parâmetros indicados no desenho experimental tendo sido seguido para cada um deles os métodos descritos de seguida.

2.3.1 Avaliação da Condição Corporal (CC)

A avaliação de CC, teve por base a escala elaborada por Edmonson et al., [31;32], que atribui uma pontuação de 1 a 5, usando uma subdivisão de 0,25 pontos de acordo com os critérios indicados na Figura D1. Esta avaliação foi realizada sempre pela mesma pessoa, uma semana antes do parto e novamente aos 14-17 dias pp. A diferença entre estes dois valores para o mesmo animal (VCC), foi calculada e também incluída na análise.

2.3.2 Medição dos Valores Séricos de Beta-Hidroxibutirato (BHB)

De acordo com alguns autores, o pico de prevalência de cetose é atingido nas duas primeiras semanas pp, tornando-a a altura ideal para monitorizar os níveis de corpos cetónicos [33]. De facto, num estudo realizado por Samiei et al. [34] demonstrou-se que o intervalo de 14-17 pp era o ideal para a deteção de cetose clínica e subclínica. Com base neste estudo, seleccionou-se esse intervalo para fazer o doseamento de BHB sérico, utilizando um dispositivo que permite a sua realização diretamente no campo. Para isso, foi recolhida uma amostra de sangue, na veia coccígea com auxílio de uma agulha de 21G e uma seringa de 3 ml (Figura 4). A colheita das amostras foi realizada em horários diferentes entre explorações, dependendo das rotinas de manejo. Após a punção venosa, foi feito o doseamento de BHB, num dispositivo Freestyle Precision Neo® (Laboratório Abbot), de acordo com as indicações do fabricante. De forma resumida, coloca-se uma fita reagente para pesquisa de BHB (fornecida pelo fabricante) no dispositivo de medição eletroquímico e de seguida deposita-se nessa fita uma gota do sangue a analisar. Após cerca de 10 segundos, a concentração de BHB é exibida no ecrã do dispositivo em unidades de mmol/L (Figura 4). O dispositivo Freestyle Precision Neo® foi o escolhido por apresentar resultados muito similares aos do método de laboratório padrão para BHB [15;35]. Também com base no método de laboratório padrão para BHB e de acordo com a maioria dos estudos, as vacas neste estudo foram categorizadas como normal, quando o nível de BHB foi $<1,2$ mmol/L, e com hipercetonémia, quando a concentração de BHB era $\geq 1,2$ mmol/L [15;35]. Os valores indicativos de hipercetonémia podem ser subdivididos em $\geq 1,2$ mmol/L e <3 mmol/L, geralmente não acompanhados de sinais clínicos e, com tal, indicativos de cetose subclínica, e em ≥ 3 mmol/L, geralmente acompanhados de sinais clínicos e, como tal, indicativos de cetose clínica [15]. Neste trabalho não se utilizou esta categorização pela ausência de um diagnóstico clínico consistente em todos os animais quando se realizou a medição dos níveis de BHB.



Figura 4. Recolha de sangue e medição de corpos cetónicos. (Fotografias Mendonça, AI 2021.)

2.3.3 Exame Clínico Genital

No exame clínico genital do pp pretendeu-se verificar a progressão da IU, e registar o momento de aparecimento do 1ºCL. Nesse sentido, o exame clínico genital consistiu na realização de uma PTV aos 14-17 dias pp, na PTR e ecografia reprodutiva aos 14-17, aos 28-30 e também aos 38-40 dias pp.

2.3.3.1 Registo de Patologias no Peri-Parto (PPP)

A recolha da informação das PPP presentes nos animais amostrados foi feita através da consulta da folha deixada na exploração desde o primeiro momento de avaliação até aos 14-17 dias pp. Assim, estas patologias incluíram: retenção de membranas fetais, metrites, mamites, deslocamento de abomaso, claudicação, cetose clínica, pneumonia e hipocalcémia.

2.3.3.2 Avaliação da Secreção Cérvico-Vaginal (SCV)

Esta avaliação foi feita aos 14-17 dias pp e consistiu, após a limpeza da zona vulvar para evitar contaminações, na PTV, com luva, e na recolha da SCV presente. O aspeto da secreção foi depois classificado seguindo os critérios de Sheldon et al., [36] e apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Classificação da secreção cérvico-vaginal aos 14-17 dias pp. Adaptado de [36].

Pontuação	Características
0	Muco translúcido e inodoro.
1	Muco translúcido com presença de alguns flocos de pús e inodoro.
2	Mucopurulento em que o pús representa menos de 50% da secreção
3	Mucopurulento em que o pús representa mais de 50% da secreção
4	Hemorrágico com odor fétido

2.3.3.3 Avaliação da Involução Uterina (IU)

Este procedimento foi realizado aos 14-17 dias pp por PTR e ecografia. O útero foi avaliado para a sua localização, tamanho, presença de linhas de involução, existência de conteúdo e a simetria dos cornos uterinos. A classificação do grau de IU foi feita de acordo com as características indicadas na Tabela 3 [36;37]. Estes parâmetros foram também avaliados aos 28-30 e 38-40 dias pp para seguimento da IU, contudo esses dados não foram utilizados neste trabalho.

Tabela 3: Classificação da involução uterina aos 14-17 dias pp. Adaptado de [36;37]

Pontuação	Características
Involução Normal 0	-Útero localizado maioritariamente na cavidade pélvica, com um comprimento correspondendo a cerca de metade do útero no final de gestação, e linhas de involução uterina claramente palpáveis; -Ligeira assimetria dos cornos uterinos; -Ausência de conteúdo intrauterino.
Involução Incompleta 1	-Útero localizado maioritariamente na cavidade abdominal, de grandes dimensões e linhas de involução não perceptíveis à palpação; -Assimetria entre cornos uterinos muito marcada; - Ausência de conteúdo intrauterino.
Involução Incompleta com Conteúdo 2	- As mesmas características de IUI, mas que adicionalmente apresenta algum conteúdo intrauterino palpável e visível à ecografia

2.3.3.4 Avaliação do reinício da atividade ovárica (1ºCL)

À semelhança do parâmetro anterior, a monitorização da atividade ovárica foi realizada aos 14-17, 28-30 e 38-40 dias pp através de PTR e ecografia, sendo que neste caso foi registado o momento de deteção do 1ºCL pp. Após a análise dos dados, elaborou-se um registo em que para cada animal foi atribuída uma pontuação de acordo com o momento da avaliação em que se detetou o 1ºCL do pp (Tabela 4).

Tabela 4. Momento de avaliação em que se identificou o 1ºCL

Pontuação	Momento de deteção do primeiro CL pp
1	14-17 dias
2	28-30 dias
3	38-40 dias
4	Não foi visto até aos 40 dias

2.3.4 Intervalo entre Parto e a 1ª Inseminação Artificial (P-1ªIA)

De acordo com a consulta do registo da exploração foi contabilizado e anotado o número de dias entre P-1ªIA, para as vacas da amostra que foram inseminadas. Este intervalo varia consoante o PVE estipulado por cada produtor, e que, como referido anteriormente, nesta amostragem variou entre 50 a 60 dias.

2.3.5 Percentagem de Prenhez à 1ªIA

O diagnóstico de gestação foi realizado, por PTR, com auxílio de ecógrafo, cerca de 30 dias após a 1ªIA. Este parâmetro corresponde ao número de animais que ficou gestante após a 1ª IA a dividir pelo total de vacas inseminadas.

2.3.6 Percentagem de vacas destinadas para Refugo

Corresponde à proporção de animais da amostra, que por decisão do produtor, e devido a problemas reprodutivos ou de produção, foram destinadas para refugo.

2.3.7. Percentagem de vacas Não Inseminadas (NI)

Proporção de vacas que, no final da recolha dos dados, não tinham ainda sido inseminadas, mas que o produtor não tem intenção de enviar para refugo. Isto deveu-se principalmente ao fato de as vacas não estarem a ciclar ou terem alguma patologia reprodutiva pois todas estavam com mais de 95 dias pp.

2.4 Processamento de Dados

Foi feito um registo dos dados em formato Excel utilizando os valores de pontuação atribuídos para cada um dos parâmetros com o descrito anteriormente, e com os níveis de corpos cetónicos e os dias desde o P-1IA.

Houve a necessidade de fazer uma análise PCA, pois é o modelo de análise estatística que nos permite distribuir o total de animais (183) em diferentes dimensões (componentes principais), tornando possível uma análise visual mais detalhada, de forma a encontrar padrões (características em comum) nos dados avaliados, sem que haja perda significativa de informação de todas as variáveis. Em cada dimensão é avaliada a variabilidade dos dados que será tanto maior, quanto maior for a contribuição de cada variável em estudo. Neste caso em particular, é fundamental que as dimensões criadas tenham elevada contribuição destas variáveis, pois permite ter maior certeza da correlação estabelecida entre elas.

Por outro lado, foi feita uma análise de agrupamentos permitindo identificar grupos de animais que partilham as mesmas características, tendo em conta as variáveis usadas, e permitindo compará-los tendo em conta fatores relevantes para a prática clínica. Foram incluídas no modelo desta análise as seguintes variáveis:

- 1- Número de partos;
- 2-Condição Corporal antes do parto (CCAP; 7 dias antes do parto);
- 3-Condição corporal no pós-parto (CCDP; 14-17 dias pp);
- 4-Variação da condição corporal entre os dois momentos anteriores (VCC);
- 5-Valor de Corpos cetónicos (BHB) séricos medido aos 14-17 dias pp;

- 6-Ocorrência e número de patologia do puerpério até 14-17 dias pp;
7. Tipo de secreção cervico-vaginal observado aos 14-17 dias pp;
- 8- Grau de involução uterina aos 14-17 dias pp;
9. Momento de detecção do 1º corpo lúteo pp;
10. Dias decorridos do parto até 1ª inseminação artificial (P-1ªIA).

Esta análise foi feita através do Software “R”, que é um programa de análise estatística de uso livre [38]. As médias e o desvio padrão das variáveis de CCAP, CCDP, VCC, nível de BHB sérico e intervalo de dias P-1ªIA foram determinadas em Excel.

3. RESULTADOS

3.1 Análise Descritiva dos Dados

Dos 183 animais que constituem a amostra, 36 (19,7%) apresentaram valores de BHB compatíveis com cetose ($\geq 1,2$ mmol/L). Do total de vacas amostradas, 31 (16,9%) apresentaram valores de BHB compatíveis com cetose subclínica ($\geq 1,2$ e < 3 mmol/L) enquanto em 2,7% (N=5) os valores eram indicativos de cetose clínica (≥ 3 mmol/L). A percentagem de vacas que ao primeiro parto apresentaram hipercetonémia foi de 6,8% (4 em 59) e em vacas com 2 ou mais partos, esta percentagem foi de 25,8% (32 em 124).

Relativamente à CCAP apenas 1,1% (N=2) dos animais apresentavam pontuação abaixo do valor mínimo desejado ($< 2,75$), mas 41,5% (N=76) tinham uma CCAP acima da pontuação máxima desejada ($> 3,25$). Quanto à VCC apenas 17,5% (N=32) das vacas tiveram um valor superior a 0,5 de CC.

No que diz respeito a patologias no peri-parto, 27,9% (N=51) das vacas apresentaram pelo menos uma destas patologias sendo que destas 31,4% (N=16) apresentavam hipercetonémia. Foi registada uma das patologias uterinas (RMF, Metrite) na maioria dos animais com patologias no peri parto (62,8%; N=32). A segunda patologia mais comumente identificada, foi a mastite, mas numa percentagem bastante mais baixa (17,7%, N=9). As restantes 19,5% (N=10) vacas apresentaram pelo menos uma das outras oito patologias indicadas.

Do total de 183 vacas da amostra, 162 foram inseminadas (88,5%) e destas 80 (49,4%) ficaram gestantes à 1ªIA, faltando ainda diagnosticar cerca de 5% (N=8) das vacas inseminadas.

Ao longo do trabalho alguns animais foram destinados a refugo, devido à baixa produção de leite ou à presença de patologias, tendo no total sido 11 animais (6%). Adicionalmente, dois animais morreram por causas não diretamente relacionadas com os parâmetros aqui avaliados. Não obstante, estes animais foram incluídos na análise de PCA

pois foram obtidos os dados até aos 40 dias pp, mas não entraram na análise do intervalo P-1ªIA nem de prenhez à 1ªIA.

3.2 Análise de Componentes Principais (PCA)

De acordo com o resultado de PCA (Figura D2), podemos verificar que a primeira componente principal (Dim 1) explica 25,6% da variabilidade dos dados enquanto a segunda componente principal (Dim 2) explica cerca de 20,5%. Embora juntas estas duas dimensões permitam já explicar quase 50% da variação dos dados, é ainda necessário acrescentar a terceira e quarta componente principal para podermos explicar mais do que 70% da variação cumulativa dos dados. As restantes dimensões (5 a 10) apenas contribuem, cada uma, para explicar menos de 10% da variação dos dados e como tal não foram consideradas.

Na Figura 5, é apresentada a correlação de cada variável com cada dimensão, e podemos verificar que as variáveis que mais contribuem para a dimensão 1 são o tipo de secreção vaginal, a presença de PPP e o grau de IU aos 14-17 dias pp. Adicionalmente, a VCC e os níveis de BHB aos 14-17 dias pp, também contribuem para esta dimensão, mas em menor grau. Já no que diz respeito à dimensão 2, as variáveis que mais contribuem são a CCAP seguida pela VCC e por fim pela CCDP. Na dimensão 3, há um conjunto de variáveis, relacionadas entre si, que contribuem de forma mais ou menos semelhante para a variância dos dados, e que são a Paridade, CCDP, níveis de BHB, SCV, IU e o intervalo P-1ªIA. Por fim para a dimensão 4, apenas contribuem duas variáveis, mas bem correlacionadas entre si, a Paridade e o intervalo Parto-1ºCL.

Pela observação da Figura D3, na qual estão representadas as duas dimensões principais (dim 1 e dim 2), podemos verificar que a VCC e o nível de BHB estão positivamente correlacionados, o que significa que vacas com maior VCC entre o parto e os 14-17 dias pp apresentaram valores mais elevados de BHB. No que diz respeito à CCAP esta também está positivamente correlacionada com a VCC e os níveis de BHB, mas em menor grau que as duas últimas entre si. Por outro lado, a presença de patologias no peri-parto, o tipo de SCV e o grau de IU estão muito associadas entre si e também positivamente relacionadas com o tempo decorrido entre o P-1ºCL bem como com o número de dias entre o P-1ªIA.

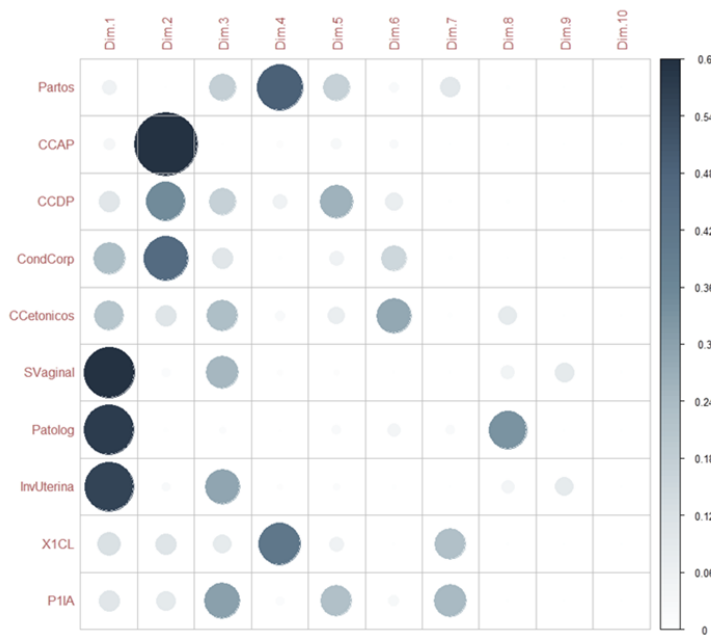


Figura 5: Contribuição de cada variável para cada dimensão. Quanto maior é a intensidade da cor e o diâmetro do círculo, maior é a correlação explicando a variância da amostra em cada dimensão. CCAP- Condição corporal antes do parto ; CCDP-Condição corporal depois do parto, CondCorp- variação da condição corporal, SVaginal- Secreção cervico-vaginal, CCetônicos- Corpos cetônicos, Patolg- Patologias do peri-parto, InvUterina-Involução uterina , X1CL- intervalo parto-1ºCL; P-1IA-intervalo parto 1ª inseminação.

3.3 Análise de Agrupamentos

Após a análise de agrupamentos é possível verificar que o Grupo 1, 2 e 3, contêm, respetivamente, 24% (N= 44) e 44,8% (N=82) e 18% (N=33) dos animais do estudo e são os grupos mais homogêneos, dada a menor dispersão dos casos/animais (Figura 7). Já o Grupo 4, que representa apenas 13,1% (N= 24) dos animais do estudo, apresenta uma maior dispersão dos casos sendo o menos homogêneo. Os animais incluídos no Grupo 1 não partilham característica com os do Grupo 3 nem 4, apenas com Grupo 2. Ao contrário, os animais incluídos ao Grupo 4, não partilham característica com os do Grupo 1 e 2, apenas com o 3. Por outro lado, como pode ser visto também na Figura 7, há uma maior sobreposição entre Grupo 2 e 3.

As principais características, referentes às variáveis estudadas, de cada grupo são apresentadas na Figura 7 e na Tabela 5.

Pela análise dos dados de cada grupo, podemos verificar que, 31,8% dos animais do Grupo 1 são vacas primíparas, sendo este o grupo em que a média de paridade/vaca é mais baixo (2,27 partos). Seguem-se lhe o Grupo 2 e Grupo 3 com uma média de paridade semelhante (2,38 e 2,39 respetivamente), mas o Grupo 2 apresenta maior proporção de vacas primíparas (37,8%), sendo mesmo o grupo com a proporção mais elevada. Pelo contrário, o Grupo 4 foi o que apresentou menor percentagem de vacas primíparas (20,8%) e, assim, também foi o grupo com a média de paridade/ vaca mais elevada (2,83).

No que diz respeito à CCAP e à VCC, as vacas do grupo 4 e do Grupo 1 tiveram, respetivamente, o primeiro (CCAP=3,52; VCC= 0,76) e o segundo (CCAP=3,44; VCC= 0,5) valor médio mais elevado. No que diz respeito à CCDP, estes dois grupos inverteram a ordem, sendo que o Grupo 1 teve um valor médio de CCDP mais elevado (2,94) que o Grupo 4 (2,76). De salientar que no Grupo 4, mais de 90% dos animais apresentavam-se ao parto com CC acima de 3,5 valores. O Grupo 2 e o 3, apresentam, valores médios de CCAP, CCDP e VCC, semelhantes entre si, e inferiores aos do Grupo 1 e 4.

Relativamente aos níveis sérico de BHB, nos Grupos 1, 2 e 3 o valor médio encontra-se abaixo do valor de referência de 1,2 mmol/L para se considerar existência de hipercetonémia (Tabela 5). Ao contrário, o valor médio de BHB no Grupo 4, é o mais elevado (1,85) de todos e está acima do valor de referência. Este é também o grupo com maior percentagem de animais (54,2%) em que os níveis de BHB ultrapassam o valor de referência. Nos restantes três grupos a percentagem de animais com níveis BHB acima de 1,2 mmol/L é semelhante e varia entre 13,4 e 15,9%.

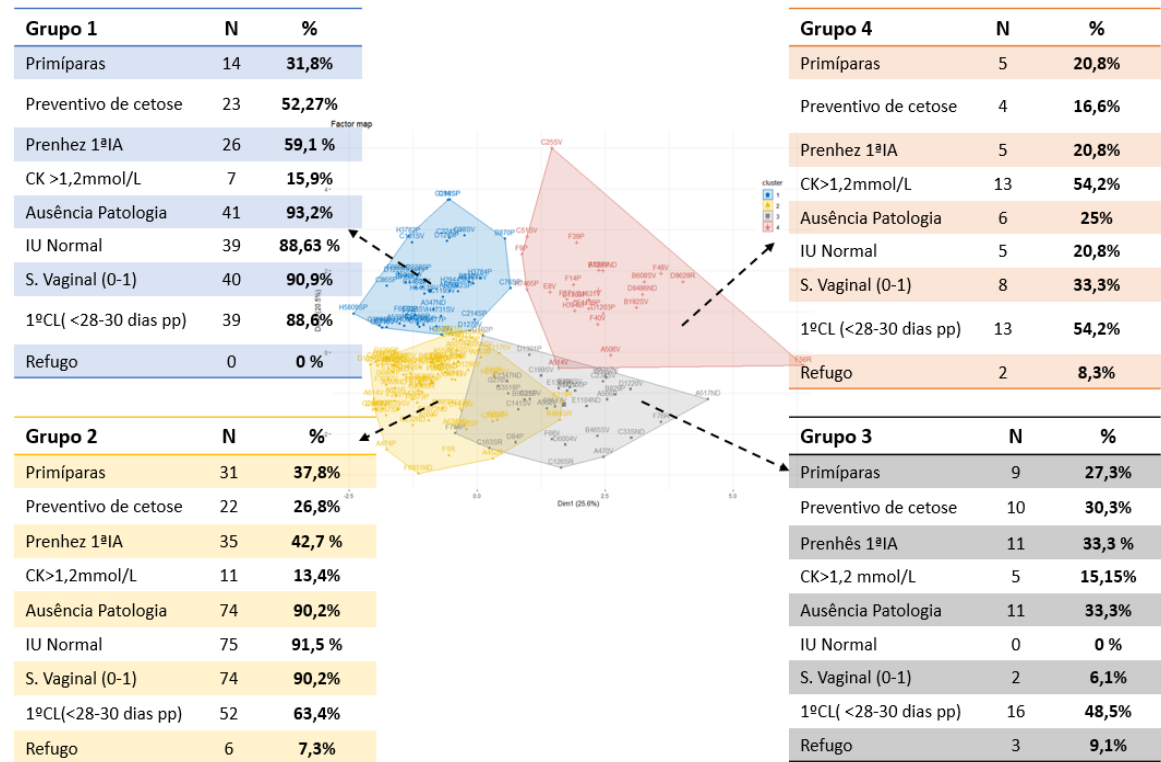


Figura 7: Representação dos 4 grupos nas duas dimensões principais e as suas principais características.

Tabela 5: Média $\pm$ desvio padrão das variáveis Paridade, CC antes do parto (CCAP), CC depois do parto (CCDP); variação da condição corporal VCC) e nível sérico de BHB para cada um dos quatro grupos.

	Paridade	CCAP	CCDP	VCC	BHB (mmol/L)	Parto-1ªIA
Grupo 1	2,27 $\pm$ 1,17	3,44 $\pm$ 0,24	2,94 $\pm$ 0,18	0,5 $\pm$ 0,19	0,83 $\pm$ 0,41	66,65 $\pm$ 15,68
Grupo 2	2,38 $\pm$ 1,53	2,94 $\pm$ 0,16	2,67 $\pm$ 0,16	0,27 $\pm$ 0,19	0,77 $\pm$ 0,47	72,86 $\pm$ 24,15
Grupo 3	2,39 $\pm$ 1,20	2,95 $\pm$ 0,15	2,65 $\pm$ 0,18	0,30 $\pm$ 0,17	0,66 $\pm$ 0,36	88,27 $\pm$ 27,64
Grupo 4	2,83 $\pm$ 1,52	3,52 $\pm$ 0,24	2,76 $\pm$ 0,26	0,76 $\pm$ 0,21	1,85 $\pm$ 1,32	76,30 $\pm$ 24,50

Uma vez que, em 3 explorações, algumas vacas foram sujeitas a protocolos preventivos de cetose, verificamos também a distribuição destes animais pelos quatro grupos. Assim, cerca de metade (52,1%) dos animais no Grupo 1 foram sujeitos a este tipo de protocolos, sendo o grupo com maior proporção de vacas sujeitas a protocolo preventivo de Cetose. Em oposição, o Grupo 4, teve a percentagem mais baixa, sendo que apenas 16% destes animais receberam protocolo preventivo de cetose. Nos Grupo 2 e 3 a percentagem destes animais teve um valor intermédio aos outros dois grupos, e muito semelhante entre si, sendo de 26,8 e 30,3%, respetivamente.

No que se refere aos dados de PPP, SCV e grau de IU, em mais de 88% dos animais do Grupo 1 e 2 a involução uterina aos 14-17 dias era normal, a pontuação de SCV não ultrapassava o 1 e também não apresentaram qualquer patologia do peri-parto. Ao contrário, no Grupo 3 a maioria dos animais (67%) apresentou uma ou mais PPP e mais de 90% apresentaram atraso na IU e uma SCV com pontuação igual ou superior a 2 aos 14-17 dias pp. No Grupo 4, a percentagem de animais que apresentaram PPP foi superior (75%) ao Grupo 3, contudo a percentagem de animais com IU atrasada e com índice de SCV maior que 2, foi menor (79% e 67% respetivamente).

Quanto aos dados do P-1º CL verificamos que o Grupo 1 é o que apresenta maior percentagem de animais em que o 1º CL pp foi observado antes dos 28-30 dias (88,63%), seguindo-se-lhe do Grupo 2 (63,4%) e por fim, com percentagens semelhantes, o Grupo 4 (54,1%) e o Grupo 3 (48,5%). Como a variável P-1ºCL está bem correlacionada com Parto-1ªIA, a ordem relativa dos grupos para esta última é igual. Assim, o Grupo 1 (66,65 dias) foi o que teve a média de dias entre Parto-1ªIA menor, seguindo-se-lhe o Grupo 2 (72,86 dias), depois o Grupo 4 (76,3 dias) e por fim, com o maior intervalo, o Grupo 3 (88,27 dias). De referir ainda que no Grupo 1, 90% das vacas foram inseminadas antes do dia 90 pp (Tabela 5 e Figura7).

O nº de vacas inseminadas foi superior a 95% em todos os grupos, sendo que foi superior no Grupo 1 (97,7%) relativamente aos restantes (96,97% Grupo 2, 96,3 Grupo 3 e 95,8% Grupo 4). No Grupo 1, do total de vacas inseminadas, 59,1% ficaram gestantes,

sendo o grupo com melhor percentagem de vacas gestantes. O Grupo 2 foi o que obteve a segunda melhor percentagem de vacas gestantes com 42,7%, seguindo depois o Grupo 3 com 33,3%. Por fim, no Grupo 4 apenas 21% ficaram gestantes, sendo o pior grupo neste parâmetro. De referir, que a percentagem de vacas que ainda não têm diagnóstico de gestação (inseminação à menos de 30 dias) é de 2,3% para o Grupo 1, 6,1 % no Grupo 2 e 3 e no Grupo 4 não falta nenhum diagnóstico.

Por fim, a percentagem de vacas que foram destinadas para refugo em cada grupo foi de 8,3% para o Grupo 4, sendo este o valor mais alto, seguindo-se os Grupos 2 e 3 com 7% e 6% respetivamente, e por fim no Grupo 1 não houve nenhuma vaca para refugo.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho a prevalência de hipercetonémia foi de 19,7%, sendo que destes 16,9% correspondiam a valores de BHB compatíveis com cetose subclínica e os restantes 2,7% com cetose clínica. Estes valores estão dentro do intervalo reportado na bibliografia de prevalência, para cetose subclínica e/ou hipercetonémia (11,2% a 47,2%) mas não para cetose clínica (3,7% a 11,6%) [6]. Esta grande variação de prevalência de hipercetonémia (subclínica e/ou clínica) na bibliografia deve-se, sobretudo, ao fato dos estudos nem sempre utilizarem os mesmos critérios de amostragem, método de deteção, fluido biológico e limiar do nível de BHB para hipercetonémia. A prevalência de cetose (subclínica ou clínica) também depende do período de lactação pois como a hipercetonémia é principalmente consequência do BEN que ocorre na vaca pp, a maior prevalência de hipercetonémia acontece nas primeiras duas semanas de lactação, diminuindo muito depois disso [6]. Além disso, alguns autores também sugerem, em particular para vacas Holstein, uma relação direta entre o aumento da paridade e hipercetonémia [6]. Assim, para interpretar e comparar corretamente a prevalência de hipercetonémia entre estudos, estes fatores devem ser levados em consideração.

Deste modo, comparando os valores obtidos neste trabalho, com os reportados para vacarias portuguesas no estudo de Suthar et al. [7], verificamos que este último tem uma prevalência de cetose subclínica e clínica superior (29,5% e 6,6% respetivamente). Porém, esta diferença, pode dever-se à utilização de critérios de amostragem distintos, pois no estudo de Suthar et al. [7] apenas foram incluídos animais com patologias do pp (geralmente também vacas com maior número de partos), enquanto no presente trabalho não foi feita essa seleção. Já no que se refere ao período de recolha de sangue para o doseamento dos níveis de BHB ele ocorreu nas primeiras duas semanas de lactação em ambos os trabalhos, contudo no de Suthar et al. [7] o intervalo de tempo utilizado foi mais longo (2-15 dias pp vs 14-17 pp), incluído assim animais que apresentaram hipercetonémia

ainda antes dos 14 dias pp. Quanto ao tipo de amostra, dispositivo utilizado e o limiar mínimo de concentração de BHB considerado, os dois estudos são análogos. Adicionalmente, é importante notar que a amostragem deste trabalho decorreu numa área geográfica mais restrita (Entre-Douro-e-Minho) e com um menor número de explorações (N=8) e de animais (N=183) comparativamente ao do trabalho de Suthar et al. [7], que obteve dados de 113 explorações e de 1000 vacas, distribuídas por todo o território Nacional, podendo por isso ser também uma amostragem mais heterogénea.

Como referido, alguns autores indicam que, em particular nas vacas Holstein, há uma relação direta entre o número de partos e a ocorrência de hipercetonémia [6]. Os resultados obtidos neste trabalho, em que a maioria das vacas amostradas são Holstein, também sugerem uma maior prevalência de hipercetonémia em vacas com dois ou mais partos em comparação com vacas primíparas (6,5% vs 25,8%, respetivamente). Isto, segundo alguns autores, em particular nas vacas de elevada produção leiteira, ocorre devido ao facto de não haver ao longo das sucessivas lactações um aumento satisfatório da ingestão de alimento, pois em animais múltiparos há um maior incremento do BEN logo no início da lactação devido, principalmente, à elevada produção de leite ao parto [39]. Na análise de componentes principais deste trabalho, a paridade não foi uma variável relevante para a variância observada nas duas dimensões principais (a 1 e 2). Todavia, observando a Figura D2, verificamos que a dimensão 3 (que representa 18% da variância dos dados) tem o contributo de diversas variáveis, mas em baixa proporção cada. Entre elas, estão o número de partos, o nível de BHB e a CCDP, que assim estão correlacionados nesta dimensão. Assim, também na análise de PCA, se verificou que o número de partos tem alguma correlação com a presença de hipercetonémia, mas outras variáveis deste estudo estão mais bem correlacionadas com os níveis de BHB e contribuem para a variância dos dados de forma mais significativa.

Os três parâmetros de CC avaliados (CCAP, VCC e CCDP), fazem parte desse grupo de variáveis, e em particular a CCAP e a VCC. Estes dois parâmetros além de estarem bem correlacionados entre si, estão também correlacionados de forma direta com o nível de BHB sérico. No entanto, a VCC (Figura D3) está mais correlacionada com os níveis de BHB do que a de CCAP. Logo, quanto maior for a VCC maior será o nível de BHB séricos, mas a associação entre uma excessiva CCAP e o aumento de corpos cetónicos é mais fraca tal como verificado no estudo de Rathbun et al. [40].

Por outro lado, os dados de CCAP, evidenciam um maneio cuidado por parte dos produtores, por forma a não ter vacas demasiado magras no pré-parto (<2,75) pois a percentagem destes animais foi de apenas 1%. Pelo contrário, a percentagem de vacas com CCAP acima do ideal foi bastante elevada (41%). Não obstante, a grande maioria das

vacas (83%) perderam pouca CC ($<0,5$) entre os 7 dias antes do parto e os 14-17 dias pp, o que pode ser indicativo dos produtores utilizarem no peri-parto algum tipo de suplementos energéticos e/ou vitamínicos para auxiliar no arranque produtivo destes animais.

Outras variáveis muito relevantes para explicar a variância dos resultados obtidos, em particular para a dimensão 1 e 3, são o número de PPP, o grau de IU e o tipo de SCV. Estas três variáveis, estão extremamente bem correlacionadas (Figura D3) significando que poderiam mesmo ser analisadas como uma só. Assim, verificou-se que quanto maior for a prevalência de PPP (de 7 dias antes do parto até 14-17 dias pp), maior a pontuação do tipo de SCV observado (mais patológico) e maior o atraso na IU aos 14-17 dias pp. A boa associação entre estas três variáveis prende-se com o fato da maioria das PPP identificadas neste trabalho serem metrites clínicas, que de acordo com a definição do termo, deve ser usado para vacas nos primeiros 10 dias pp que apresentarem IU retardada e SCV fétida, podendo ou não apresentar febre (<21 dias pp) [36]. Esta boa correlação entre patologia uterina, SCV e IU pode ser mais débil após os 21 dias pp, pois nessa altura já se considera uma endometrite, cuja definição é menos clara que a da metrite [36].

Relativamente a correlação observada entre estas variáveis e os níveis de BHB séricos, ela não é muito elevada, mas ocorre na dimensão 1 e 3. Assim, o nível de BHB séricos parece aumentar, à medida que aumenta o número de patologias presentes no animal durante o peri-parto, bem como com a pontuação do tipo de secreção cérvico-vaginal observado (mais patológico) e com maior atraso na involução uterina pp aos 14-17 dias, ou vice-versa. A análise de PCA, não nos permite saber se é o aumento dos valores de BHB que determinam maior risco de desenvolvimento de patologias, ou o contrário. De fato, a relação entre hipercetonémia e outras patologias que ocorrem no início da lactação é ainda pouco clara. Alguns autores citados por Benedet et al. [6] bem como Mellado et al. [41] sugerem que a condição de BEN no início da lactação e o stress fisiológico que ocorre durante a hipercetonémia tem um papel na depressão do sistema imunológico e como consequência, vacas com hipercetonémia têm maior risco de serem afetadas por metrite e claudicação. Contudo, Jae-Kwan et al., [42] observou que vacas que apresentavam patologias uterinas tinham maior risco de desenvolvimento de cetose em comparação com vacas sem patologias uterinas.

Em relação à mastite, estudos citados por Benedet, et al [6] indicam que vacas com hipercetonémia têm maior probabilidade de ter mastite no primeiro mês de lactação em comparação com vacas saudáveis, mas outros observaram que a inflamação do úbere causou o aumento da concentração de BHB no leite e outros ainda não encontraram associação entre hipercetonémia e mastite. Relativamente ao deslocamento de abomaso, a maioria dos estudos sugere que a hipercetonémia é a causa do deslocamento de

abomaso [6]. Porém, McArt et al. [29] verificou que algumas vacas tiveram deslocamento do abomaso antes de ser diagnosticadas com hipercetonémia.

Os parâmetros reprodutivos incluídos na análise de PCA, P-1ºCL e P-1ªIA estão diretamente e muito bem correlacionados entre eles. Assim, a identificação do 1º CL depois do dia 28-30 pp, parece ser um indicador para um intervalo P-1ªIA mais longo. Por outro lado, estes parâmetros reprodutivos estão mais bem correlacionados com os três parâmetros ligados a PPP e a patologias uterinas (SCV e IUI), pois estão no mesmo quadrante e na mesma dimensão, do que com as variáveis de VCC e níveis de BHB séricos. Desta forma, à medida que temos mais PPP e características de SCV e IU mais patológicas, o intervalo P-1ºCL aumenta e, consequentemente, também aumentam os dias em aberto. Estes resultados estão em acordo com a maioria dos estudos publicados, que indicam que vacas leiteiras com distocia, RMF, metrite, mamite ou outras doenças que ocorrem geralmente nos primeiros 45 dias pp têm mais dias em aberto e influenciam negativamente o desempenho reprodutivo [25;26]. Ainda relativamente ao parâmetro P-1ºCL, na dimensão 4, é visível uma boa associação entre esta variável e a paridade. Esta relação poderá ser explicada pela maior incidência de SCV patológica e IU incompleta à medida que aumenta a paridade e que, de acordo com alguns estudos, poderá estar relacionada com atraso no reinício da ciclicidade ovárica [43]

Com base nas quatro dimensões mais relevantes, o conjunto inicial de 183 vacas foi distribuído por quatro grupos distintos que serão aqui analisados tendo em conta o objetivo geral deste estudo, que é o de avaliar o impacto de hipercetonémia aos 14-17 dias pp na performance reprodutiva em bovinos de leite.

Verificamos que o Grupo 1 e 2 foram os que apresentaram melhores resultados nas variáveis relacionadas com os parâmetros reprodutivos. Assim, nestes dois grupos a grande maioria das vacas reiniciou a atividade ovárica pp até aos 30 dias, teve o menor número de dias em aberto e (Parto-1ªIA,) e a maior percentagem de vacas gestantes à 1ªIA. Simultaneamente, mais de 88% dos animais destes grupos são saudáveis, não apresentando qualquer patologia de peri-parto nem uterina. Apesar destas semelhanças nos parâmetros reprodutivos, a diferença na CCAP e VCC entre estes grupos é muito notória. Pois enquanto o Grupo1 é constituído principalmente por vacas com CC ao parto considerada excessiva ($CCAP \geq 3,5$) e com uma VCC também acima do recomendado ($< 0,5$), no Grupo 2 estes dois parâmetros, são inferiores, e estão muito ajustados aos valores recomendados. O padrão do grupo 1, é considerado na literatura como um importante fator de risco para desenvolvimento de hipercetonemia [5]. Do mesmo modo, também no presente trabalho se detetou uma boa associação entre hipercetonémia e estas duas variáveis. Apesar disto, no Grupo 1, à semelhança no Grupo 2, o nível médio de BHB sérico

encontra-se abaixo do limiar de referência de hipercetonémia ($\geq 1,2\text{mmol/L}$) e a proporção de indivíduos que apresentaram valores acima deste limiar é semelhante nos dois grupos e menor que 16%. Este resultado, poderá ser explicado pelo facto no Grupo 1 os produtores das explorações terem em consideração a elevada CCAP e como tal forneceram aos animais preventivos de cetose (aminoácidos essenciais, glicose e monensina) com o objetivo de reduzir o risco de desenvolvimento de Cetose. E, de fato, mais de 50% dos animais do grupo 1 foram submetidos a algum tipo de protocolo preventivo de cetose, sendo o grupo com maior proporção destes animais.

Esta possível associação, é ainda suportada pelo facto de no Grupo 4, que à semelhança do Grupo 1 inclui maioritariamente vacas com CCAP elevada ($\text{CCAP} \geq 3,4$) e com VCC acima do recomendado ($> 0,5$), mas onde apenas 16,6% dos animais do Grupo foram sujeitos a protocolos preventivos de cetose, o valor médio de BHB sério está acima do valor de referência para hipercetonémia e a percentagem de animais que apresentaram valores de BHB compatíveis com hipercetonémia foi a mais elevada com 54%. Simultaneamente, no Grupo 4 a prevalência de patologias peri-parto e uterinas foram mais elevadas que no Grupo 1 e os valores dos parâmetros reprodutivos foram piores, sendo mesmo o grupo com pior percentagem de vacas gestantes à 1ª IA.

Num estudo realizado por Walsh et al., [25], em que se comparou dois grupos de animais com hipercetonémia em que um foi sujeito a tratamento com monensina e o outro não (grupo controlo), concluiu-se que a monensina reduziu significativamente os níveis séricos de BHB. Adicionalmente, os animais do grupo tratado com monesina também apresentaram melhores parâmetros reprodutivos que o grupo não tratado, especificamente menor intervalo P-1ª ovulação e melhor percentagem de gestação à 1ª IA [25]. Simultaneamente, ao fornecer outros tratamentos preventivos como vitaminas e glicose, o sistema imunitário fica mais reforçado e pode reduzir o aparecimento de patologias associadas, sendo uma boa prática na gestão das explorações.

Por fim o Grupo 3 apresentou valores muito semelhantes aos do Grupo 2 nas três variáveis de CC, paridade e mesmo nível sérico de BHB, todavia no que diz respeito a percentagem de vacas com SCV e IUI indicativos de patologia uterina aos 14-17 dias, este foi o grupo com piores resultados, não incluindo mesmo nenhuma vaca avaliada com IU normal. Deste modo, como poderia ser expectável, este foi também o grupo com a média mais elevada de P-1ª IA e a segunda percentagem mais baixa de prenhez à 1ª IA.

Diversos estudos citados por Benedet et al. [6], indicam a existência de uma associação entre patologias uterinas e hipercetonémia, embora a definição de causa ou efeito seja disputado. No presente estudo esta associação não foi clara, pois no Grupo 4 temos uma associação entre PPP (entre as quais uterinas) e elevada proporção de animais

com hipercetonémia, mas o mesmo não ocorre no Grupo 3, onde também temos elevada percentagem de PPP mas a proporção de animais com hipercetonémia é bastante mais baixa e o valor médio de BHB é inferior ao limiar de referência. Contudo, isto pode também ser explicado, à semelhança do que foi dito anteriormente, pela maior percentagem de animais que tiveram tratamento preventivo de cetose no Grupo 3 (30%) comparativamente com o Grupo 4 (16%). Independentemente disso, nestes dois grupos com os piores parâmetros reprodutivos, é claro o contributo das patologias uterinas (maioria) e da hipercetonémia para estes resultados, tal como também, para a percentagem de vacas destinadas para refugo. Estando esta observação, em concordância com um estudo de Walsh et al. [25] que sugere que patologias uterinas mesmo quando tratadas convenientemente, reduzem a taxa de conceção em cerca de 20% e mais de 3% das vacas ficam inférteis em comparação com animais que não apresentam patologias uterinas. Do mesmo modo, outro estudo também sugere que em vacas com hipercetonémia na segunda semana pp a probabilidade de prenhez à 1ª IA, é reduzida em pelo menos 20%, em comparação com animais sãos [44].

No estudo aqui apresentado, verificou-se que as rotinas e maneios nutricionais entre as explorações estudadas eram diferentes. Contudo, na análise dos dados optou-se, á semelhança de outros estudos sobre Cetose, por considerar a vaca como a unidade experimental e não as explorações. Por outro lado, dificuldade de acesso a informações como a produção média/vaca/dia e medições do teor de ácido butírico nas silagens nas explorações, não possibilitou fazer uma análise mais exaustiva dos fatores de risco de cetose. Por último, o tipo de análise utilizada (PCA), é do tipo exploratório permitindo estabelecer um grau de associação entre muitas variáveis, e a distribuição dos animais, mas não permite quantificar, essas relações.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo, verificamos que há uma boa associação entre a hipercetonémia aos 14-17 dias pp, e uma CCAP excessiva ao parto e, também com a VCC (antes e pós-parto). Os resultados também sugerem que, no caso de animais com CCAP excessiva, a adoção de medidas preventivas, tais como manejo nutricional e em particular protocolos preventivos de cetose, ao evitarem uma grande VCC e ocorrência de hipercetonémia aos 14-17 dias pp, parecem impedir a deterioração dos parâmetros reprodutivos. Adicionalmente, as variáveis associadas a patologias uterinas identificadas até aos 14-17 dias pp foram, dentro das variáveis estudadas, as que mais contribuíram para a diminuição do desempenho reprodutivo.

REFERÊNCIAS

- [1] Nazeer M, Kumar S, Jaiswal M (2019). Biochemical markers of ketosis in dairy cows at post-parturient period. **Biological Rhythm Research**, 52:1-8.
- [2] Huertas-Molina OF, Londoño-Vásquez D, Olivera-Angel M (2020). Hipercetonemia: bioquímica de la producción de ácidos grasos volátiles y su metabolismo hepático. **Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica**, 23:1-11.
- [3] Van Knegsel ATM, Van Den Brand H, Dijkstra J, Kemp B (2007). Effects of dietary energy source on energy balance, metabolites and reproduction variables in dairy cows in early lactation. **Theriogenology**, 68:274-280.
- [4] Wang X, Li X, Zhao C, Hu P, Chen H, Liu Z, Liu G, Wang Z (2012). Correlation between composition of the bacterial community and concentration of volatile fatty acids in the rumen during the transition period and ketosis in dairy cows. **Applied and Environmental Microbiology**, 78: 2386-2392.
- [5] Roche JR, Friggens NC, Kay JK, Fisher MW, Stafford KJ, Berry DP (2009). Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. **Journal of Dairy Science**, 92:5769-5780.
- [6] Benedet A, Manuelian CL, Zidi A, Penasa M, De Marchi M (2019). Invited review: β -hydroxybutyrate concentration in blood and milk and its associations with cow performance. **Animal**, 13:1676-1689.
- [7] Suthar VS, Canelas-Raposo J, Deniz A, Heuwieser W (2013). Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 96:1-14.
- [8] Ghahfarokhi SM, Samani AD, Samani AD (2018). Ketosis (acetonaemia) in dairy cattle farms: practical guide based on importance, diagnosis, prevention and treatments. **Journal of Dairy Veterinary Animal Research**, 7: 299-302.
- [9] Zhang G, Ametaj B (2020). Ketosis an Old Story Under a New Approach. **Dairy**, 1: 42–60.
- [10] Månsson HL (2008). Fatty acids in bovine milk fat. **Food & Nutrition Research**, 52:1-3.
- [11] Van Knegsel ATM, Van Den Brand H, Dijkstra J, Van Straalen WM, Jorritsma R, Tamminga S, Kemp B (2007b). Effect of glucogenic vs. lipogenic diets on energy balance, blood metabolites, and reproduction in primiparous and multiparous dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, 90:3397-3409.
- [12] Djokovic R, Ilic Z, Kurcubic V, Petrovic M, Cincovic M, Petrovic MP, Perovic VC (2019). Diagnosis of subclinical ketosis in dairy cows. **Biotechnology in Animal Husbandry**, 35:111-125.

- [13] El-Deeb WM; El-Bahr SM, (2017). Biochemical markers of ketosis in dairy cows at postparturient period: Oxidative stress biomarkers and lipid profile. **American Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, 7: 86-90.
- [14] Van Saun RJ, (2007). Metabolic and Nutritional Diseases of the Puerperal Period. Em Youngquist RS, Threlfael WR (2ªEdition), Current Therapy in Large Animal Theriogenology (pp.355-378).USA: Saunders Elsevier.
- [15] Macmillan K, Helguera IL, Behrouzi A, Gobikrushanth M, Hoff B, Colazo MG (2017). Accuracy of a cow-side test for the diagnosis of hyperketonemia and hypoglycemia in lactating dairy cows. **Research in Veterinary Science**, 115: 327-331.
- [16] Gillund, P., O. Reksen, Y. T. Gröhn, and K. Karlberg. 2001. Body condition related to ketosis and reproductive performance in Norwegian dairy cows. J. Dairy Sci. 84:1390-1396
- [17] Santschi D, Lefebvre D, Cue R, Girard C, Pellerin D (2011). Incidence of metabolic disorders and reproductive performance following a short (35-d) or conventional (60-d) dry period management in commercial Holstein herds. **Journal of Dairy Science**, 94: 3322–3330.
- [18] Geishauser T, Leslie K, Kelton D, Duffield T (2001). Monitoring for Subclinical Ketosis in Dairy Herds. **Food Animal** 23:65-70.
- [19] Enjalbert F, Nicot MC, Bayourthe C, Moncoulon R (2001). Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: Relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. **Journal of Dairy Science**, 84: 583-589.
- [20] Chaput C, Sirard MA (2019). Embryonic response to high beta-hydroxybutyrate (BHB) levels in postpartum dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, 72:1-17.
- [21] Elanco (2020). Keto-test. Consultado em <https://www.elanco.us/products-services/dairy/keto-test>, a 18 de fevereiro de 2021.
- [22] Crowe MA, Diskin MG, Williams EJ (2014). Parturition to resumption of ovarian cyclicity: Comparative aspects of beef and dairy cows. **Animal**, 8: 40-53.
- [23] Manning AI (2019). Clinical and subclinical ketosis in dairy cattle. **Livestock**, 24:13-17.
- [24] Peter AT, Vos PLAM, Ambrose DJ (2009). Postpartum anestrus in dairy cattle. **Theriogenology**, 71:1333-1342.
- [25] Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, 123:127-138.
- [26] Bisla A, Yadav V, Dutt R, Singh G, Chand Gahalot S (2018). Fertility Augmentation Approaches in Dairy Animals - A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 7:2995-3007.

- [27] Bisinotto RS, Greco LF, Ribeiro ES, Martinez N, Lima FS, Staples CR, Thatcher WW, Santos JEP (2012). Influences of nutrition and metabolism on fertility of dairy cows. **Animal Reproduction**, 9: 260-272.
- [28] Rutherford AJ, Oikonomou G, Smith RF (2016). The effect of subclinical ketosis on activity at estrus and reproductive performance in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, 99: 4808–4815.
- [29] McArt JAA, Nydam DV, Oetzel GR (2012). Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, 95: 5056–5066.
- [30] Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR (2010). Associations of elevated nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the north eastern United States. **Journal of Dairy Science**, 93:1596–160.
- [31] Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G (1989) A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. **Journal of Dairy Science** 72:68-78.
- [32] Elanco (1997). Appendix A: Body Condition Scoring in Dairy Cattle
- [33] Vince S, Đuričić D, Valpotić H, Gračner D, Folnožić I, Špoljarić B, Sobiech P, Samardžija M (2017). Risk factors and prevalence of subclinical ketosis in dairy cows in Croatia. **Veterinarski Arhiv**, 87:13-24.
- [34] Samiei A, Liang JB, Ghorbani GR, Hirooka H, Ansari-Mahyari S, Sadri H (2013) Prevalence of Ketosis and its Correlation with Lactation Stage, Parity and Peak of Milk Yield in Iran. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, 8:604-612.
- [35] Iwersen M, Klein-Jöbstl D, Pichler M, Roland L, Fidschuster B, Schwendenwein I, Drillich M (2013). Comparison of 2 electronic cowside tests to detect subclinical ketosis in dairy cows and the influence of the temperature and type of blood sample on the test results. **Journal of Dairy Science**, 96:7719–7730.
- [36] Sheldon I M, Lewis GS, Leblanc S., Gilbert RD. (2006). Defining post-partum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, 65:1516-1530.
- [37] Elmetwally MA (2018). Uterine Involution and Ovarian Activity in Postpartum Holstein Dairy Cows. A Review. **Journal of Veterinary Healthcare**, 1: 29-39.
- [38] R core Team. Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing. {Vienna, Austria, 2020. <https://www.R-project.org>}
- [39] Coffey MP, Simm G, Oldham JD, Hill WG, Brotherstone S (2004). Genotype and Diet Effects on Energy Balance in the First Three Lactations of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, 8: 4318–4326.
- [40] Rathbun FM, Pralle RS, Bertics SJ, Armentano LE, Cho K, Do C, Weigel KA, White HM (2017). Relationships between body condition score change, prior mid-lactation

phenotypic residual feed intake, and hyperketonemia onset in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 100: 3685–3696.

- [41] Mellado M, Garcia JE, Deras FGV, Santiago M, Mellado J, Gaytán LR, Angel-Garcia O (2018). The effects of periparturient events, mastitis, lameness and ketosis on reproduction performance of Holstein cows in a hot environment. **Australian Journal of Veterinary Science**, 50:1-8.
- [42] Jae-Kwan J, In-Soo C, Sung-Ho M, Soo-Chan L, Hyun-Gu K, Young-Hun J, Soo-Bong P, Ill-Hwa K (2017). Risk Factors for Ketosis in Dairy Cows and Associations with Some Blood Metabolite Concentrations. **Journal of Veterinary Clinics**, 34: 255-260.
- [43] Neave HW, Lomb J, von Keyserlingk MAG, Behnam-Shabahang A, Weary DM (2017). Parity differences in the behavior of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 100: 548–561.
- [44] Walsh RB, Walton JS, Kelton DF, LeBlanc SL, Leslie KE, Duffield TF (2007). The Effect of Subclinical Ketosis in Early Lactation on Reproductive Performance of Postpartum Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, 90: 2788–2796.

Anexo A

Tabela A1: Casuística do Estágio

Bovinos de Leite	
Sistema Reprodutivo	Nº casos
Visitas de fertilidade e acompanhamento reprodutivo	660
Metrite	73
Retenção placentária	63
Fetos mumificados	2
Partos distócicos	8
Torções uterinas	5
Fetos enfisematosos	2
Auxílio na preparação e execução de tratamentos intrauterinos	5
Sistema Locomotor/ Músculo-esquelético	Nº casos
Lacerações no membro	4
Traumatismos na espinhal medula	2
Lesões no plexo braquial	2
Lesões nervo ciático	1
Luxações da articulação coxofemoral	3
Fratura da articulação coxofemoral	2
Sistema Respiratório	Nº casos
Pneumonia simples	25
Pneumonia por aspiração em bovinos adultos	2
Pneumonia em Vitelos	20
Pneumonia por aspiração em vitelos	3
Glândula Mamária	Nº casos
Mamites	43
Sistema Digestivo	Nº casos
Timpanismo em vitelos	4
Indigestões lácteas e vitelos	12
Diarreia em Vitelos	60
Clostridiose em Vitelos	1
Timpanismo em Bovinos adultos	2
Indigestões Simples	40
Diarreia em bovinos adultos	10
Clostridioses em bovinos adultos	12
Reticulo pericardite traumática	4
Peritonite	3
Cirurgia	Nº casos
Deslocamento de Abomaso à esquerda (DAE) - piloropexia e omentopexia	10
Deslocamento de Abomaso à direita (DAD) - piloropexia e omentopexia	3
Enucleação de globo ocular	1
Distúrbios metabólicos e Desequilíbrio Aniônico	Nº casos

Cetose clínica	15
Lipidose Hepática/ Fígado Gordo	3
Hipocalcemia clínica	9
Hipomagnesiemia	1
Dermatologia	Nº casos
Dermatofitose	3
Profilaxia	Nº casos
Vacinação do efetivo leiteiro (BVD; IBR; PI3)	10
Vacinação do efetivo leiteiro- Clostridium	5
Vacinação do efetivo leiteiro - Mamites	2
Diagnóstico Laboratorial	Nº casos
Recolha de fezes de vitelo para pesquisa de agente	6
Necrópsias	Nº casos 4
Bovinos de Carne	
Sistema Reprodutivo	Nº casos
Visitas de fertilidade	6
Cães e Gatos	
Profilaxia	Nº casos
Vacinação	20
Desparasitação	10
Neoplasia	Nº casos
Fístula perianal	2
Hemangiossarcoma	1
Processos traumáticos	Nº casos
Abcesso maxilar	1
Suíños	
Dermatologia/ Infecilogia	Nº casos
Mal Rubro	1
Sistema respiratório	Nº casos
Pneumonia	1
Sistema digestivo	Nº casos
Anorexia	2
Ovinos	
Sistema Nervoso Central	Nº casos
Meningoencefalite	1
Distúrbio nutricional	Nº casos
Letargia	1
Caprinos	
Sistema Respiratório	Nº casos
Pneumonia	1

Sistema Reprodutivo	Nº casos
Visitas de fertilidade	5
Sistema Digestivo	Nº casos
Diarreia	3

ANEXO B

Quadro 1: Fatores de risco para o desenvolvimento de cetose

- CC ao parto > 3,25 e perda de CC [5].
- Partos gemelares e períodos de secagem prolongados (> 2 meses) [17].
- Elevada produção de leite no pp [8]
- Doenças do peri-parto associadas a BEN (mamites, metrites, retenção placentária, deslocamento abomaso) [8].
- Paridade =1 ou > 3, dependendo do tipo de raça [6].
- Raça Jersey mais predisposta a cetose que a raça Holstein [6].
- Ingestão de silagens mal conservadas contendo elevadas concentrações de ácido butírico [9].



Figura B1: keto-test para medição do BHB no leite. (Em <http://www.agrodistribution.fr/ra/lowres>)

Quadro B2: Métodos de diagnóstico laboratorial [12]

Espectometria (EITF)

Simple, pouco dispendioso, rápido;
Usado em grande escala;
Mede BHB em amostras de sangue e leite para detecção de CSC;
Maior sensibilidade e especificidade para detectar CSC nas amostras anteriormente referidas.

Catálise enzimática

Deteção de BHB no soro de leite/sangue
Requer uso de espectrofotômetro
Teste padrão para determinação de cetose em vacas de leite

Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cromatografia líquida

Deteção de acetato e BHB em amostras de leite e sangue;
RMN apresenta sensibilidade e especificidade de 69% e 92%, respetivamente.

Fluorometria

Mede BHB em amostras de sangue e leite;
Resultados mantidos fiáveis mesmo quando ocorre hemólise dos eritrócitos;
Avalia elevado número de amostras de leite.

Anexo C

Quadro C1:Tipos de anestro pp

Anestro tipo I

- Ocorre crescimento folicular com emergência, sem ocorrer desvio e/ ou desenvolvimento de folículo dominante (Peter et al., 2009).
- Geralmente associado a períodos de carências nutricionais e vitamínicas (Peter et al., 2009)

Anestro tipo II

- Ocorre emergência, desvio e crescimento do folículo não acompanhado de dominância, culminando em regressão folicular (Peter et al., 2009).
- Regressão do folículo geralmente consequência de uma nova onda de crescimento folicular (Peter, et al 2009).

Anestro tipo III

- Ocorre contrário dos restantes, emergência, desvio, crescimento e estabelecimento do folículo dominante.
- Não ocorre ovulação (Crowe et al., 2014; Peter et al., 2009).
- Conversão numa estrutura folicular persistente podendo converter-se em quisto cujo diâmetro é superior a 20mm. (Quisto) (Crowe et al., 2014; Peter et al., 2009;).

Anestro tipo IV

- Possui fase lútea prolongada após ter ocorrido ovulação de um folículo dominante.
- Pode estar relacionado com ausência de um folículo dominante secretor de estradiol incapaz de induzir a produção de prostaglandina pelo útero (Crowe et al., 2014; Peter, 2009).

Anexo D

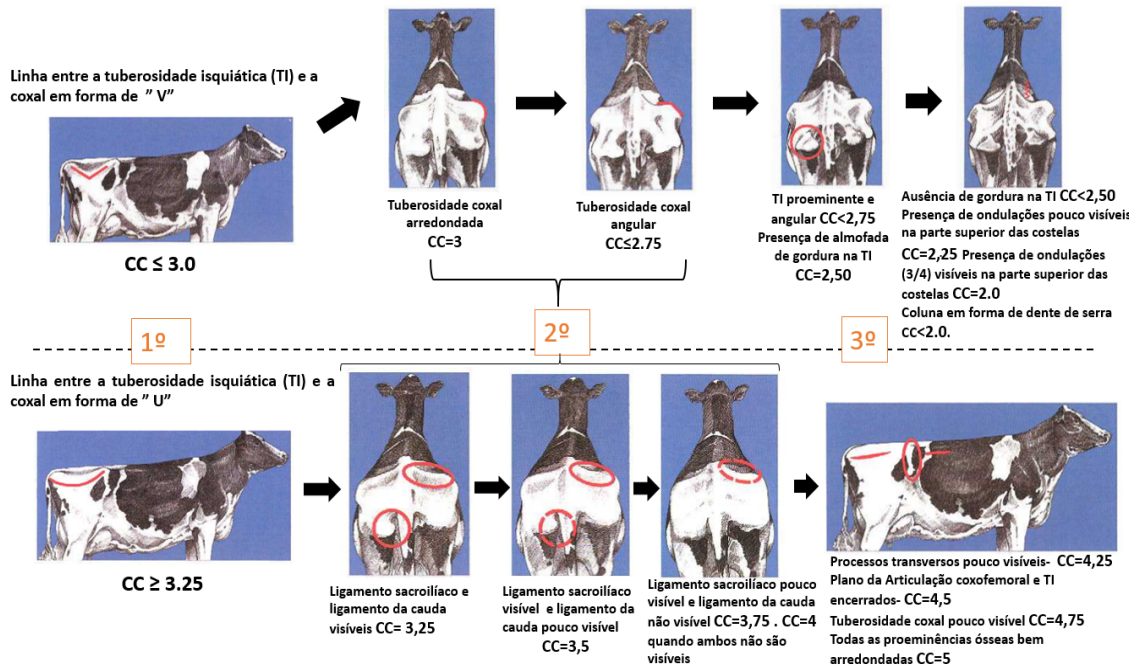


Figura D1- Avaliação da Condição Corporal de 1-5 e utilizando as subdivisões de 1/4 de ponto, segundo Edmonson et al., (1989). Imagem retirada de Elanco, (1997)

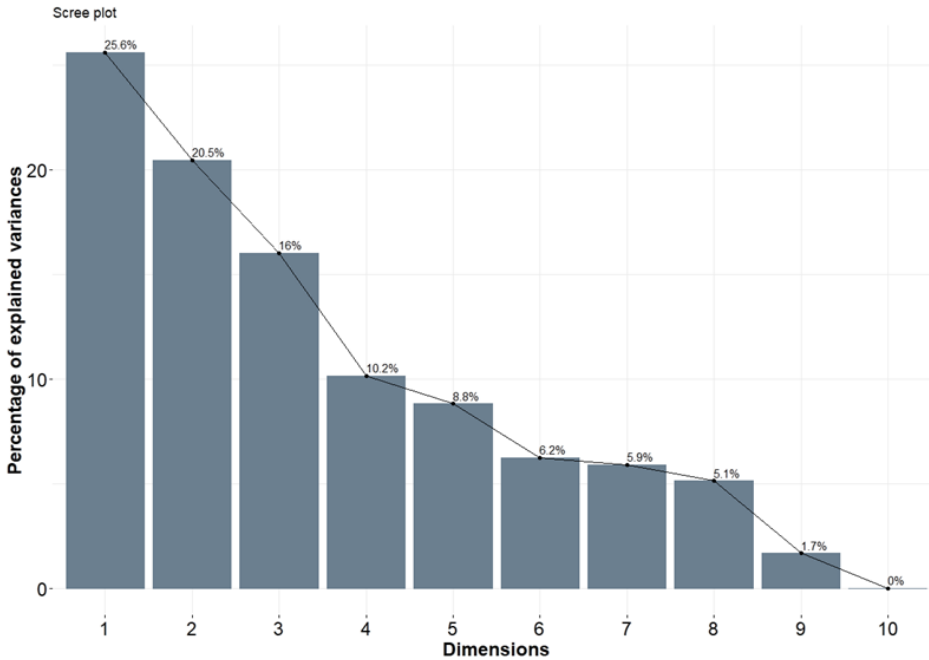


Figura D2: Número de dimensões e as respectivas percentagens das variâncias dos dados

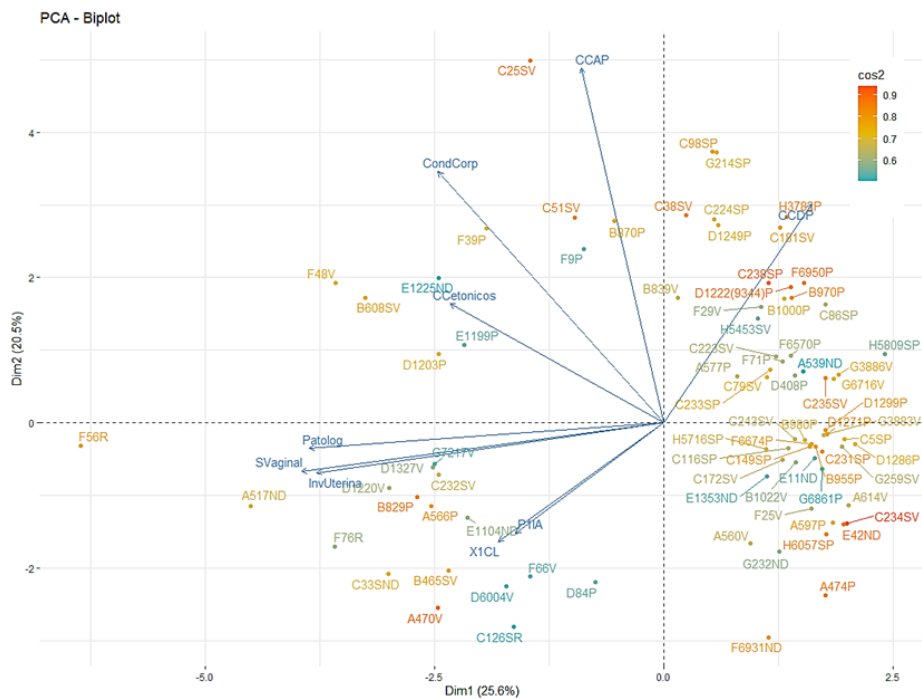


Figura D3: “Plot” de animais (pontos e cores) e variáveis (vetores) nas dimensões 1 e 2 mostrando a correlação entre variáveis (vetores próximos).