

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**DISTÚRBIOS DO METABOLISMO ENERGÉTICO EM VACAS DE ALTA
PRODUÇÃO**

Marta Luís Faria Pires Cruz

Orientadora:

Prof. Dra. Carla Maria Proença Noia de Mendonça

Co-Orientadores:

Dra. Joana Filipa Vilas Boas Correia

Dr. Frédéric Sanspoux

Porto 2015

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

DISTÚRBIOS DO METABOLISMO ENERGÉTICO EM VACAS DE ALTA PRODUÇÃO

Marta Luís Faria Pires Cruz

Orientadora:

Prof. Dra. Carla Maria Proença Noia de Mendonça

Co-Orientadores:

Dra. Joana Filipa Vilas Boas Correia

Dr. Frédéric Sanspoux

Porto 2015

RESUMO

No âmbito da conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, realizei um estágio de dezasseis semanas, na área de clínica e cirurgia de animais de produção, sendo que oito delas foram passadas na Cooperativa Agrícola de Vila do Conde e as restantes oito na clínica CapVéto na região de Limousin, em França.

O meu principal objectivo para o estágio foi aprofundar e consolidar os conhecimentos adquiridos durante os cinco anos de curso pela aproximação intensiva às práticas clínicas e cirúrgicas em diferentes contextos e realidades de campo, o que me levou a optar por dividi-lo entre Portugal e França.

Este modelo de estágio proporcionou-me a oportunidade de acompanhar veterinários muito experientes e de participar em diferentes atividades nas áreas da medicina, da clínica e da cirurgia de animais de produção, em diferentes contextos.

Foi no decurso do estágio, realizado na Cooperativa Agrícola de Vila do Conde entre 5 de Janeiro a 27 de Fevereiro, que surgiu a ideia para o tema da presente tese – Distúrbios do Metabolismo Energético em Vacas de Alta Produção. A oportunidade de experimentar a utilidade dos bolus Bolifast Physio, um suplemento alimentar cujos componentes principais são a colina e metionina, foi a motivação para este trabalho.

Procedi então a uma ampla e intensa revisão bibliográfica da cetose - relacionada com o metabolismo de adaptação ao balanço energético negativo – e elaborei o trabalho prático que visa verificar o efeito dos bolus de colina e metionina, protegidas da degradação ruminal, como tratamento desta patologia, as quais são explanadas no presente relatório.

DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

Durante a parte do estágio realizada na Cooperativa Agrícola de Vila do Conde tive a oportunidade de participar no dia-a-dia da Dr. Joana Correia e do Dr. António Ventura. Nas primeiras quatro semanas, acompanhei o Dr. Ventura, nas brigadas de Sanidade Oficial da OPP (Organização de Produtores Pecuários), na prática de clínica ambulatória e no controlo reprodutivo dos efetivos, e nas restantes quatro semanas acompanhei a Dr. Joana com quem, para além da clínica ambulatória e controlo reprodutivo, pude participar nas atividades relativas ao programa de controlo da qualidade do leite, tendo tido a oportunidade de realizar os procedimentos inerentes ao programa, desde a recolha das amostras e o seu processamento, até à identificação dos agentes patogénicos e o manejo terapêutico mais indicado para cada caso de mamite.

A Clínica Veterinária CapVéto, sendo uma clínica mista, com serviços para animais de companhia e espécies pecuárias, proporcionou-me um amplo contacto com práticas clínicas e cirúrgicas e também uma visão diferente da metodologia e organização. Durante o estágio nesta clínica estive integrada nas atividades relativas aos animais de produção, sobretudo bovinos e ovinos para carne sendo os animais de pequeno porte como vitelos, ovelhas e cordeiros transportados para a clínica para observação, diagnóstico e intervenção, e os de grande porte examinados e intervencionados em regime ambulatório. Durante as 8 semanas de estágio acompanhei 5 veterinários nas suas atividades, essencialmente de prática clínica e cirúrgica.

Nas tabelas 1, 2 e 3, do Anexo III, apresento a casuística representativa das atividades em que participei durante as 16 semanas de estágio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à Professora Dra. Carla Mendonça, orientadora do meu estágio, pela disponibilidade e apoio durante a elaboração da tese e, principalmente, pela simpatia com que sempre me recebeu e esclareceu as minhas dúvidas.

À Doutora Joana Correia, por ter aceite ser co-orientadora de estágio, pela disponibilidade, pelo contributo para a realização deste trabalho, por toda a paciência e amizade.

À Doutora Isabel Santos pelos conhecimentos que me transferiu e pela simpatia com que me acolheu.

Ao Doutor Ventura por me ter aceite como estagiária e por todos os conhecimentos e boa disposição.

À Cooperativa Agrícola de Vila do Conde, onde estagiei durante oito semanas, sem esquecer os seus copros directivos, funcionários e estagiários, a quem quero agradecer por me terem recebido tão bem e me terem proporcionado momentos muito bem passados!

A toda a equipa da CapVéto, muito obrigada! Ao Doutor Frédéric Sanspoux por ter aceite de imediato receber-me e porque sem ele o meu estágio em Bellac não teria sido possível. Pela sua boa disposição e entusiasmo contagiante. À Doutora Marion Le Blond pela amizade, motivação e por ser uma inspiração para fazer mais e melhor. Ao Doutor Christian Dauphin por todos os conhecimentos transmitidos e pelos conselhos que não esquecerei. Aos Doutores Pierre Autef e Thierry Duclairioir por todos os ensinamentos e pela paciência que sempre tiveram. A todos os restantes membros da equipa: Morgane, Monique, Charlotte, Maeva e Caroline por me terem acolhido tão bem e me terem proporcionado um excelente ambiente de trabalho.

Ao Tiago, pela companhia nos momentos mais solitários, pela orientação em França e pelas aventuras que nunca esquecerei! À Mariana por ter sido um forte pilar, pelas dicas e opiniões. Não posso deixar de agradecer à Marie, Delphine e Ludmila pelos momentos de descontração e por terem tornado a minha experiência em Bellac mais acolhedora!

A todos os colegas da faculdade, principalmente aos que viveram comigo os momentos mais felizes, e também os mais decepcionantes, que me acompanharam durante 6 anos nesta montanha russa que foi, sem dúvida, a melhor viagem de todas: Julie, Ana Manuela, Sara, Carol e Joana.

À Mafalda, Susana, Renato, Cláudia e Inês por serem a família que escolhi! Por me conhecerem tão bem, por estarem sempre comigo (mesmo à distância) e por tornarem o meu

“coração radiante”. Um forte obrigada pelo que são, por tudo o que fazem por mim, por me apoiarem a 100% e por perdoarem as minhas ausências durante os exames, ou a tese!

A toda a minha família, tios e primos, pelo orgulho que sentem em mim! À prima, pelo amor e irmandade, pelo afeto e compreensão, principalmente nas épocas mais duras. E pelo maravilhoso caril de frango e outras iguarias! Ao meu afilhado Diogo por me encher de alegria e por achar que também ainda sou pequenina.

Ao meu irmão, pelo amor, carinho e proteção, por estar sempre presente na minha vida, por exigir sempre o melhor de mim e por ser o exemplo que quero seguir.

Ao meu avô, pela sabedoria, pelas histórias e parábolas, que nunca são por acaso.

Por último, mas mais importante, quero agradecer aos meus pais. Por sempre me apoiarem e encorajarem ao longo da minha vida. Por me estimularem a ser sempre melhor e a lutar por aquilo que quero. Pelos conselhos mais puros e pelo desejo que têm da minha felicidade. Pelo orgulho que todos os dias demonstram em mim. Por tudo o que sou, com orgulho em vós, agradeço do fundo do coração!

LISTA DE ABREVIATURAS

NEB – Balanço Energético Negativo

AGNE – Ácidos Gordos Não Esterificados

BHB – β -Hidroxibutirato

AcAc – Acetoacetato

DMI – Ingestão de Matéria Seca

RPC – Colina Protegida da Degradação Ruminal

AGV – Ácidos Gordos Voláteis

HC – Hidratos de Carbono

CPT1 – Carnitina Palmitoil Transferase

CoA – Coenzima A

FIA – Análise por Injecção em Fluxo

FTIR – Espectometria de Infravermelho com Transformada de Fourier

VLDL - Very Low Density Lipoprotein

MTTP - Proteína Microssomal de Transferência de Triglicerídeos

GLX - GlucoMen LX Plus

FSP - FreeStyle Precision

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES	vii
AGRADECIMENTOS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
ÍNDICE	xi
1 Metabolismo energético das vacas leiteiras em balanço energético negativo.....	1
1.1 Balanço energético negativo.....	1
1.2 Alimentação e digestão de hidratos de carbono	1
1.3 Síntese de energia durante os períodos de NEB.....	2
1.3.1 Neogluco-génese.....	2
1.3.2 Metabolismo lipídico.....	2
1.3.3 Cetogénese.....	3
1.4 Regulação hormonal	4
1.5 Inter-relações metabólicas das fontes energéticas na adaptação ao NEB	5
2 Cetose em vacas leiteiras.....	6
2.1 Fisiopatologia e Etiologia da Cetose.....	6
2.2 Formas clínicas de cetose.....	7
2.2.1 Cetose do tipo I	7
2.2.2 Cetose do tipo II – “síndrome da vaca gorda”	8
2.3 Fatores de risco	8
2.3.1 Fatores nutricionais.....	9
2.3.2 Fatores relacionados com o animal	9
2.3.3 Fatores relacionados com o manejo	9
2.4 Sinais clínicos.....	10
2.5 Importância da cetose subclínica na exploração leiteira	10
2.5.1 Cetose e a produção de leite.....	10
2.5.1 Cetose subclínica e consequências na reprodução.....	11
2.5.2 Cetose e supressão do sistema imunitário	12
2.5.3 Cetose associada a patologias.....	12
2.5.3.1 Deslocamento do abomaso	12

2.5.3.2	Patologias uterinas	12
2.5.4	Perdas económicas associadas à cetose	12
2.6	Epidemiologia.....	13
2.6.1	Taxa de prevalência e taxa de incidência.....	13
2.6.2	Epidemiologia.....	14
2.7	Métodos de diagnóstico.....	14
2.7.1	Diagnóstico epidémico-clínico	15
2.7.2	Métodos de diagnóstico laboratoriais	16
2.7.2.1	Testes sanguíneos	16
2.7.3	Métodos de diagnóstico realizados diretamente na exploração.....	16
2.7.3.1	Testes da urina.....	16
2.7.3.2	Testes do leite	17
2.7.3.3	Testes rápidos do sangue	17
2.7.4	Estratégias para avaliar a cetose subclínica no efetivo.....	18
2.7.5	Detecção de corpos cetónicos no Contraste Leiteiro	19
3	Tratamento	20
4	Prevenção	22
5	Efeito da aplicação de bolus à base de colina e metionina para tratamento de cetose	23
	Bibliografia.....	27
	Anexo I	30
	Anexo II	31
	Anexo III	32

1 Metabolismo energético das vacas leiteiras em balanço energético negativo

1.1 Balanço energético negativo

O balanço energético negativo (NEB) é universal entre as vacas leiteiras nas primeiras semanas de lactação porque as alterações metabólicas e endócrinas que estes animais experimentam, durante o período de transição, são enormes. Indiscutivelmente, no início da produção de leite, os maiores desafios são o aumento da necessidade de cálcio e de glucose. Estima-se que as necessidades de glucose e energia metabolizável aumentam duas a três vezes desde três semanas antes até três semanas após o parto (Herdt & Gerloff 2009; Drackley *et al.*, 2001).

Nas últimas três semanas antes do parto, quando o requerimento de nutrientes do feto atinge um nível máximo, a ingestão de matéria seca (DMI), pela vaca, diminui progressivamente. Esta diminuição ocorre devido a alterações hormonais e diminuição da capacidade do rúmen. Contudo há uma compensação associada ao aumento da síntese de glicogénio no fígado e no músculo, bem como ao aumento do uso da glucose para síntese de NADPH₂ e glicerol para a lipogénese. Consequentemente, durante o período seco, as vacas conseguem aumentar o glicogénio no fígado e a condição corporal (Drackley *et al.*, 2001).

Já nas três semanas após o parto, a DMI é insuficiente para suportar a produção de leite e respectivo gasto energético (McCarthy *et al.*, 2015). Como se pode verificar na fig. 1, nesta fase, existe uma discrepância de cerca de 500g/d, entre as necessidades de glucose e o que é ingerido. Desta forma, o fígado deve adaptar-se, rapidamente, quer para fornecer a quantidade de glucose necessária para a intensa produção de leite, quer para processar o fluxo de ácidos gordos não-esterificados (AGNE), provenientes da excessiva mobilização de gordura. Por isso, o fígado desempenha um papel muito importante no metabolismo e gere o fluxo de nutrientes que participam na gestação e lactação (Drackley *et al.*, 2001).

1.2 Alimentação e digestão de hidratos de carbono

A alimentação dos ruminantes consiste em compostos orgânicos como hidratos de carbono (HC), proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, ácidos orgânicos, vitaminas e compostos inorgânicos que são os minerais. Os hidratos de carbono são a principal fonte de energia durante os períodos de NEB, no entanto, a sua digestão não é realizada por enzimas digestivas, como nos animais monogástricos. Pelo contrário, ocorre fermentação microbiana destes HC, no rúmen, formando-se os ácidos gordos voláteis (AGV), representados pelos ácidos acético, butírico e propiónico, que são depois absorvidos e são considerados a maior fonte nutricional dos ruminantes (McDonald *et al.*, 2011; Kaneko *et al.*, 2008; Andrews *et al.*, 2004).

O ácido butírico será transformado em β -hidroxibutirato (BHB) e acetoacetato (AcAc) pela mucosa intestinal, o ácido acético - que não sofre transformação ao nível da parede ruminal – serve como fonte de energia para o organismo e promove a produção da matéria gorda do leite. O ácido propiónico será metabolizado no fígado e dará lugar à neoglucogénese, sendo considerado o maior precursor da glucose. O ácido láctico - também ele um precursor da glucose - é sintetizado a partir da transformação do ácido propiónico, pela mucosa intestinal e pode também ser produzido nos músculos (Kaneko *et al.*, 2008; Drackley *et al.*, 2001; Andrews *et al.*, 2004).

1.3 Síntese de energia durante os períodos de NEB

1.3.1 Neoglucogénese

Uma vez que ocorre fermentação dos HC e a capacidade de armazenamento está diminuída, a absorção intestinal destes nutrientes é limitada e pouco contribui para a homeostase das vacas em lactação. Assim, apesar de serem ingeridos, não reúnem a energia necessária ao animal e devem ser sintetizados a partir de fontes alternativas de energia como lactato, glicerol, aminoácidos glucogénicos e, principalmente, propionato. Devo enfatizar, que a assimilação limitada de HC tem um significado mais importante em animais que estão no início da lactação já que assumem um papel de destaque no que toca à alimentação destes animais e promovem a síntese de lactose (McDonald *et al.*, 2011; Kaneko *et al.*, 2008; Andrews *et al.*, 2004).

O principal processo, pelo qual as necessidades energéticas durante a lactação são satisfeitas, nos ruminantes é a neoglucogénese. Este é um mecanismo contínuo, que visa a produção de glucose e ocorre, principalmente, no fígado, mas também nos rins. A molécula central é o ácido oxaloacético (AOA), intermediário metabólico do ciclo de krebs e precursor da glucose. Esta molécula, deriva de vários compostos, que contribuem para a neoglucogénese: ácido propiónico, o substrato mais importante que é produzido pela fermentação ruminal; aminoácidos, excepto leucina e lisina que são cetogénicas; ácido láctico e apenas pequenas quantidades de glicerol (Smith 2008; McDonald *et al.*, 2011; Andrews *et al.*, 2004; Drackley *et al.*, 2001).

Como demonstrado na fig. 2, a partir dos variados substratos, decorrem diversos eventos bioquímicos, sequenciais, que resultam na formação de glucose-6-fosfato e, por fim, de glucose.

1.3.2 Metabolismo lipídico

O tecido adiposo é uma fonte de energia importante para o animal e é formado por células que contêm triglicerídeos. No início da lactação, as vacas produtoras de leite experimentam um aumento da mobilização das reservas lipídicas para suportar a produção de leite, o seu teor

lipídico e o NEB (Santos & Lima, 2007). Para tal, os triglicerídeos são libertados pelo tecido adiposo na circulação sanguínea na forma de ácidos gordos não esterificados (AGNE) e glicerol. Os AGNE libertados podem ser utilizados como fonte energética em vários tecidos, nomeadamente na glândula mamária, fígado, baço e músculo (Kaneko *et al.*, 2008; Herdt & Gerloff 2009).

No fígado, os AGNE podem ser re-esterificados para a produção de triglicerídeos ou podem ser metabolizados em corpos cetónicos. Os triglicerídeos esterificados permanecem no fígado até serem oxidados e secretados, contudo, a secreção é um processo que requer o transporte para os tecidos periféricos pelas VLDL (very low density lipoprotein). Estes VLDL são uma associação de colesterol, triglicerídeos, fosfolípidos, apolipoproteínas produzidas pelo fígado (apolipoproteína B-100, apolipoproteína A-1) e proteína microssomal de transferência de triglicerídeos (MTTP). Uma vez incorporados nos VLDL e segregados no sangue, os triglicerídeos podem ser usados em vários tecidos como energia ou transportados para a glândula mamária para a síntese de gordura do leite (Herdt & Gerloff 2009; Kaneko *et al.*, 2008; McArt *et al.*, 2013; Goselink *et al.*, 2013).

Contudo, a síntese e secreção das VLDL é limitada e relativamente baixa, no caso dos ruminantes (quer por causa do consumo excessivo de AGNE, quer por causa do défice de produção das VLDL), o que contribui para o armazenamento excessivo de triglicerídeos nos hepatócitos, cujo funcionamento se altera. Falamos, então, de lipidose hepática, consequência da alteração da neoglucogénese. Vários estudos demonstram que 50 a 60% das vacas em transição experienciam moderada a severa lipidose hepática (Cooke *et al.*, 2007; Goselink *et al.*, 2013; Drackey *et al.*, 2001).

1.3.3 Cetogénese

A formação dos corpos cetónicos ocorre no fígado e no rim a partir de acetil-coA, resultante da β -oxidação dos AGNE, mas também pode ocorrer no epitélio ruminal a partir do ácido acético e, sobretudo, do ácido butírico no decurso da sua absorção. Após a formação da acetil-coA ela é internalizada no interior das mitocôndrias e pode ser (1) consumida no ciclo de krebs, depois de se ligar a um ácido oxaloacetato, ou (2) transformada em corpos cetónicos libertados na corrente sanguínea. A passagem pela parede mitocondrial está dependente da atividade de uma enzima, a Carnitina Palmitoil Transferase ou CPT1. A sua atividade é também regulada pelo malonil-coA, molécula da transformação do citrato, em condições onde muita glucose está disponível. Assim, em caso de NEB (pouca glucose mobilizável) pouco citrato é produzido, portanto, pouco malonil coA é produzido, isto resulta numa ativação da CPT1, a passagem dos

AGNE para a mitocôndria e a produção de corpos cetônicos (Smith 2008; Drackley *et al.*, 2001; Kaneko *et al.*, 2008).

Estes corpos cetônicos representados pela acetona, aceto-acetato e β -hidroxibutirato podem ser utilizados, na quase totalidade dos tecidos, como substrato energético e o aumento da cetogênese é uma estratégia utilizada no período de transição para compensar a diminuição da ingestão alimentar de precursores da glucose (Drackley *et al.*, 2001).

1.4 Regulação hormonal

As hormonas são fundamentais na regulação do metabolismo energético da vaca leiteira e na adaptação ao NEB. Estes mediadores endócrinos atuam principalmente no metabolismo lipídico ao inibir ou ativar a lipólise e a lipogénese. O princípio geral da adaptação do metabolismo ao NEB não é alterado pelas influências endócrinas, no entanto é regulado por elas (Kaneko *et al.*, 2008).

A insulina é a hormona metabólica fulcral durante o período de NEB, quando há hipoinsulinémia - devido a uma série de alterações que ocorrem na altura do parto em prol da produção de leite. Como consequência, diminui a secreção de insulina e, desta forma, há redução da captação de glucose pelos tecidos periféricos (adiposo e músculo), para facilitar a assimilação da glucose pela glândula mamária, já que este não é um tecido responsivo à insulina. Para além disso, a insulina tem também efeitos no metabolismo lipídico, nomeadamente no tecido adiposo onde a insulina estimula a lipogénese e inibe a lipólise, o que resulta na diminuição da concentração sanguínea de AGNE. No fígado, inibe a atividade do CPT1, diminuindo assim o transporte de AGNE para o interior da mitocôndria, evitando a cetogénese. Além do mais, a insulina aumenta a esterificação de AGNE, o que resulta no aumento da síntese de triglicédeos (Kaneko *et al.*, 2008; Butler *et al.*, 2003; Drackley *et al.*, 2001).

O glucagon tem uma ação inversa à da insulina, contudo é tão importante como ela na adaptação ao NEB. O glucagon actua essencialmente no fígado, onde estimula a lipólise e a neoglucogénese. Para além disso ele promove a ativação da CPT1, consequentemente a entrada de AGNE na mitocôndria e a síntese de corpos cetônicos (Kaneko *et al.*, 2008; Drackley *et al.*, 2001).

Existem outras hormonas com um papel importante no controlo do metabolismo do tecido adiposo. Os mediadores da família das catecolaminas - adrenalina e noradrenalina – que são potentes promotores da lipólise. A noradrenalina é secretada pelo sistema simpático, ao nível das terminações nervosas na célula adiposa, e provoca uma descarga significativa de AGNE na circulação sanguínea. A adrenalina é secretada pela glândula adrenal e tem os mesmos efeitos que a noradrenalina, é libertada em caso de stress e é responsável por uma libertação massiva

de AGNE no sangue. O controlo da atividade do sistema simpático é realizado nos centros cerebrais sensíveis ao balanço energético (Kaneko *et al.*, 2008; Drackley 1999; Smith 2008).

A hormona do crescimento (GH) também intervém na regulação do metabolismo e é secretada quando há hipoglicémia, por isso, a sua secreção plasmática é naturalmente alta no início da lactação. A GH favorece a mobilização de AGNE, como consequência da diminuição da lipogénese. Outras hormonas tais como leptina, o cortisol e as hormonas da tiróide também influenciam e orientam o metabolismo em situações de NEB, porém, a ação destas hormonas não é tão significativa como das hormonas anteriormente citadas (Drackley 1999; Kaneko *et al.*, 2008; Smith 2008)

1.5 Inter-relações metabólicas das fontes energéticas na adaptação ao NEB

O grande desafio na compreensão do metabolismo das vacas leiteiras, na fase de transição, é a integração da informação das interações específicas entre a fonte de energia e a sua utilização nos órgãos e tecidos. Esta informação baseia-se na disponibilidade de glucose, AGNE e corpos cetónicos (Herdt 2000).

Quando a glicémia se eleva, a lipogénese é favorecida, o que resulta na supressão da libertação de AGNE pelo tecido adiposo e na diminuição da concentração destes no sangue. A insulina é a hormona reguladora, evidenciando a influência direta da glucose. Ou seja, o aumento da concentração glucose conduz ao aumento da concentração de glicerol no interior dos adipócitos e promove o armazenamento de ácidos gordos, na forma de triglicerídeos, porque há forte inibição da β -oxidação (Drackley *et al.*, 2001). Em contrapartida a hipoglicémia que ocorre durante o NEB, é a causa do aumento da libertação dos AGNE e glicerol, a partir da gordura armazenada. Este processo sofre a influência da diminuição do rácio insulina:glucagon e também da concentração alta da somatropina (Radostits *et al.*, 2000; Kaneko *et al.*, 2008).

Por sua vez, a concentração sanguínea de AGNE vai influenciar a disponibilidade de glucose sanguínea, ao inibir diretamente a captação da glucose pelas células. Para além disso, regulam a taxa de corpos cetónicos no sangue, ou seja, um aumento da taxa de AGNE leva ao aumento do metabolismo de acetil-coA para produção de corpos cetónicos, especialmente quando há baixos níveis de glucose. Também os corpos cetónicos, utilizados como fonte adicional de energia para o músculo, são poupadores de glucose, e promovem a sua concentração no sangue ao inibirem a lipólise (Herdt 2000; Kaneko *et al.*, 2008).

2 Cetose em vacas leiteiras

A cetose é um distúrbio metabólico comum das vacas leiteiras, especialmente de alta produção. Geralmente ocorre três a seis semanas após o parto que é quando ocorre o período de NEB.

2.1 Fisiopatologia e Etiologia da Cetose

Para perceber o surgimento e manifestação da cetose é indispensável fazer uma revisão do metabolismo subjacente ao início de lactação e NEB, nas vacas leiteiras. Devemos ter em conta que, embora a patogenia ainda não esteja completamente compreendida, requer a combinação da intensa mobilização de ácidos gordos com elevadas necessidades de glucose (Divers & Peek 2008).

Os ruminantes são particularmente vulneráveis à cetose, uma vez que têm dificuldades em absorver os HC. Como tal, é essencial existir uma fonte direta de glucose quer para o metabolismo dos tecidos, quer para a formação de lactose. Para além disso, nas últimas semanas de gestação, as mudanças hormonais e a diminuição da capacidade do rúmen vão causar a diminuição da ingestão de nutrientes e/ou o aumento da lipólise. Na altura do parto as necessidades energéticas aumentam para a produção de leite, e o NEB instala-se (Radostits *et al.*, 2000; Andrews *et al.*, 2004; Divers & Peek., 2008)

Posto isto, para satisfazer os requerimentos associados a uma elevada produção de leite, a vaca leiteira conta com duas fontes de nutrientes: a ingestão alimentar e as reservas corporais. Relativamente aos nutrientes obtidos a partir da dieta, sabemos que 80% dos hidratos de carbono ingeridos são fermentados pela microflora ruminal em AGV - ácido acético, propiónico e butírico - que são absorvidos. Grande parte da glucose necessária é, então, proveniente do ácido propiónico que é incorporado no ciclo de krebs e convertido a glucose pela neoglucogénese. Também aminoácidos glucogénicos, ácido láctico e glicerol são precursores da glucose pelo mesmo processo (Andrews *et al.*, 2004)

A produção reduzida de ácido propiónico no rúmen irá resultar na produção deficitária de glucose e, conseqüente, hipoglicémia que promove a mobilização de ácidos gordos livres e glicerol. Neste caso, os músculos esqueléticos e cardíaco podem utilizar os ácidos gordos como fonte energética (Andrews *et al.*, 2004; Drackley *et al.*, 2001; Divers & Peek 2008). Como já foi referido, os ácidos gordos são metabolizados por β -oxidação, o que resulta na produção de acetil-coA, que em períodos de balanço energético positivo, combina com o oxaloacetato para participar no ciclo de krebs. Porém, em NEB, o oxaloacetato é usado diretamente na neoglucogénese, esgotando-se. Logo, este composto é o fator limitante do ciclo de krebs e, como conseqüência, promove a acumulação de acetil-coA que é utilizada na cetogénese para formar

os corpos cetônicos. Os tecidos, com exceção do fígado, podem utilizar corpos cetônicos, mas a sua produção excede a taxa de utilização e, assim, eles acumulam-se resultando em cetose (Andrews *et al.*, 2004; Cooper 2014).

A cetose primária ocorre em vacas no início de lactação, estando associada a variados fatores, nomeadamente nutricionais, de manejo, entre outros. Pelo contrário, a cetose secundária ocorre como consequência de uma patologia que curse com diminuição do apetite, nomeadamente patologias infecciosas (mamite, metrite, endometrite, etc.), deslocamentos de abomaso, obstruções/oclusões, patologias podais, entre outras (Andrews *et al.*, 2004; Divers & Peek 2008; Radostits 2000).

2.2 Formas clínicas de cetose

Esta doença metabólica pode ter apresentação subclínica ou clínica. Na vaca leiteira, a cetose subclínica caracteriza-se pela presença, no sangue, de concentrações anormalmente elevadas de corpos cetônicos com ausência de sinais clínicos. Segundo vários estudos, o limiar varia entre 1000 e 1400 μ mol/L de BHB e não ultrapassa os 3000 μ mol/L, limite a partir do qual a vaca desenvolve uma cetose clínica (Enjalbert *et al.*, 2001; Duffield *et al.*, 2009; Oetzel 2004; McArt *et al.*, 2011).

Na prática é mais fácil perceber a cetose com uma parte do cenário metabólico. É, por isso, comum classificar a cetose em dois tipos, baseado em processos fisiológicos e circunstâncias clínicas que levam a cetose. O mecanismo associado ao aparecimento dos dois tipos de cetose é totalmente diferente, no entanto, tem a mesma origem: a disponibilidade de glucose. A cetose do tipo I desenvolve-se por causa de um défice de ingestão de precursores da glucose na alimentação, tendo a neoglucogénese hepática um bom desempenho. A cetose do tipo II desenvolve-se devido à falha da neoglucogénese provocada por uma disfunção hepática, sendo que, o aporte de glucose é suficiente. Os casos de cetose do tipo I - os mais comuns - ocorrem, usualmente, no pico de produção de leite, ao passo que a cetose de tipo II ocorre, geralmente, imediatamente após o parto (Herdt & Gerloff 2009; Divers & Peek 2008).

2.2.1 Cetose do tipo I

A origem deste tipo de cetose é a diminuição da ingestão alimentar que culmina num défice energético, progressivamente mais significativo à medida que se aproxima do pico de lactação. Como consequência, as vias neoglucogénicas são estimuladas ao máximo, há diminuição do rácio insulina:glucagon e uma forte atividade da CPT1. Assim, os AGNE entram rapidamente, nas mitocôndrias das células hepáticas, e transformam-se em corpos cetônicos. Há, portanto, uma forte cetogénese com níveis elevados de corpos cetônicos no sangue. A extensa utilização desses AGNE, para a síntese de corpos cetônicos, significa que muito poucos

irão ser utilizados para a síntese de triglicerídeos e haverá pouca acumulação de gordura no fígado.

Em suma, este tipo de cetose caracteriza-se por uma concentração sanguínea elevada de corpos cetônicos sem sobrecarga hepática e adequa-se na descrição clássica de “cetose espontânea” (Herdt 2004; Kaneko *et al.*, 2008; Herdt & Gerloff 2009; Oetzel 2007).

2.2.2 Cetose do tipo II – “síndrome da vaca gorda”

Como já foi referido, o transporte dos triglicerídeos acumulados no fígado, para os outros tecidos, necessita da síntese e da secreção das VLDL. Contudo, os ruminantes têm capacidade limitada de produção dessas proteínas, sobretudo no início da lactação. Ainda por cima, a capacidade do fígado para mobilizar os triglicerídeos - quando a taxa de AGNE sanguínea aumenta - é baixa e assim, desenvolve-se lipidose hepática (Cooke *et al.*, 2007; Goselink *et al.*, 2013; Drackey *et al.*, 2001).

Ainda não se conhece completamente o efeito que a lipidose hepática pode suscitar durante a adaptação ao NEB, mas algumas evidências sugerem que ao ocorrer antes do parto interfere com a capacidade neoglucogénica do fígado. Assim, considera-se que a cetose do tipo II desenvolve-se quando uma grande quantidade de AGNE é depositada no fígado – que ocorre após a lipólise e mobilização -, reduzindo a neoglucogénese e a disponibilidade de glucose. De seguida, há a alteração do metabolismo dos AGNE que passa da esterificação para a cetogénese (Herdt & Gerloff 2009)

Os casos de cetose do tipo II caracterizam-se por níveis sanguíneos de insulina normais a elevados, mesmo simultaneamente a NEB (Cooper 2014). Este período de hiperinsulinémia que pode ocorrer antes do desenvolvimento de sinais clínicos, deve-se à existência de alguma resistência à insulina que as vacas experimentam. Isto acontece para que a insulina seja redirigida para tecidos não dependentes da insulina, como a glândula mamária (Lucy *et al.*, 2014). Para além disso, a concentração sanguínea de corpos cetônicos é relativamente baixa, ao passo que a concentração de glucose é mais elevada do que na cetose do tipo I (Oetzel 2007).

2.3 Fatores de risco

Existem diversos fatores de risco que podem levar a que as vacas manifestem cetose. Contudo, existem dados discordantes sobre a importância dos fatores de risco para a cetose clínica e subclínica, que provavelmente refletem que a doença pode ser a causa ou o efeito da interação dos fatores (Raboisson *et al.*, 2014).

2.3.1 Fatores nutricionais

A cetose das vacas leiteiras pode ser uma consequência de um desequilíbrio alimentar, qualitativo ou quantitativo. A redução da produção de ácido propiônico, no rúmen, é geralmente uma característica da diminuição da ingestão de alimentos, causada por manejo alimentar inadequado ou por inapetência dos animais. No entanto, pode também dever-se a um déficit de vitamina B12 ou cobalto, utilizado para a síntese dessa vitamina, indispensáveis no metabolismo do propionato. Bem como, carência em fósforo ou aminoácidos (McDonald *et al.*, 2011).

Pode ainda ser provocada pela ingestão de silagens mal conservadas, com taxas elevadas de ácidos butírico e láctico - precursores de acetil-coA e de corpos cetônicos -, o que aumenta o risco de cetose (Cooper 2014; Andrews *et al.*, 2004). Para além disso, a passagem de um regime pobre em energia para um regime rico em energia no periparto pode, igualmente ser gerador de cetose. Estas dietas com excesso de energia favorecem a produção de AGV cetogénicos e estão associadas a um baixo pH ruminal. A acidose que daí resulta leva a uma diminuição da digestão de celulose, tendo como consequência a redução da síntese de ácido propiônico. É ainda interessante evidenciar, que o excesso de glúcidos pode originar endotoxémia, situação patológica conhecida por ser responsável por lipidose hepática (Rukkwamsuk *et al.*, 1998; Janovick *et al.*, 2011; Herdt 2000).

2.3.2 Fatores relacionados com o animal

As vacas que desenvolvem cetose do tipo I têm normalmente uma boa condição corporal ou podem até ser magras. Pelo contrário, uma condição corporal de 3,5 ou mais, na altura do parto, está associada a um risco aumentado de desenvolver cetose do tipo II. Segundo Gillund *et al.*(2001), as vacas que desenvolveram cetose deste tipo tinham a condição corporal mais elevada em relação às vacas saudáveis, antes do diagnóstico da doença, e perderam mais condição corporal durante o distúrbio. Existem ainda vários estudos que corroboram esta associação e outros onde não se observou nenhuma relação significativa entre BCS e cetose

As vacas múltiparas serão mais susceptíveis a desenvolver os dois tipos de cetose do que as primíparas. Isto acontece porque a produção de leite é mais intensa nas vacas com mais do que um parto e, estes animais, também podem ter mais frequentemente elevada condição corporal, para além disso o sistema imunitário é menos eficaz, logo são mais predispostos a patologias que cursam com anorexia. Vacas com partos gemelares têm maior risco de desenvolver cetose na fase terminal da gestação (Herdt & Gerdoff 2009; Raboisson *et al.*, 2014).

2.3.3 Fatores relacionados com o manejo

O manejo inadequado é um fator de risco, que promove a manifestação de cetose num efetivo e vários parâmetros poderão intervir, como por exemplo: permitir períodos secos

demasiado longos; a colocação no mesmo lote de vacas gestantes e lactantes, o que provoca o aumento da condição corporal das vacas gestantes; infraestruturas inadequadas, com espaços limitados, temperatura elevada, falta de ventilação, que provocam stress e, conseqüentemente, descarga de catecolaminas e diminui a ingestão de alimento, o que aumenta o risco de desenvolver uma patologia durante o período periparto (Janovick *et al.*, 2011; Divers & Peek 2008).

2.4 Sinais clínicos

Os sinais clínicos associados à cetose são, normalmente, bastante subtis e a hipoglicémia é o parâmetro mais significativo no início do desenvolvimento dos sinais clínicos da cetose. Os sintomas dominantes são diminuição da produção de leite (dois a quatro dias antes dos sinais clínicos mais óbvios), gradual perda de apetite e conseqüente perda de condição corporal. Frequentemente os animais têm apetite seletivo, ou seja, preferem forragem aos concentrados. E à medida que a perda de apetite agrava, os outros sinais também.

Nesta fase, é possível sentir um odor frutado, típico da cetose, no ar expirado, urina e leite. Para além disso, as fezes são mais duras, escuras e secas. A temperatura retal e sinais vitais – pulsação e movimentos respiratórios – estão normais, mas o animal encontra-se letárgico e com relutância ao movimento.

A minoria dos animais experienciam distúrbios do sistema nervoso central – cetose nervosa. Os animais podem exibir variados sinais neurológicos como salivar excessivamente, lamber todo o tipo de superfícies, movimentos de mastigação anormais, comportamento agressivo, incoordenação com cegueira aparente, entre outras. Geralmente, os sinais nervosos só duram algumas horas e os animais voltam ao estado normal. As vacas com cetose secundária apresentam também os sinais associados à patologia primária, devendo esta ser corrigida em primeiro lugar (Andrews *et al.*, 2004; Herdt 2014; Divers & Peek 2008; Smith 2008).

2.5 Importância da cetose subclínica na exploração leiteira

Vários estudos demonstraram que a cetose subclínica está associada a um risco aumentado de desenvolvimento de várias patologias, distúrbios reprodutivos, alterações da produção de leite e promove perdas económicas significativas (Cooper 2014; Raboisson *et al.*, 2014).

2.5.1 Cetose e a produção de leite

A relação entre a produção de leite e a cetose subclínica é ambígua, com associações opostas para as vacas primíparas e múltiparas e nas medições de corpos cetónicos entre a primeira semana e a segunda semana após o parto (Raboisson *et al.*, 2014).

Alguns autores dizem que, as circunstâncias fisiológicas particulares que as novilhas experienciam no início da lactação, pode explicar a associação positiva entre cetose subclínica e a produção de leite. No entanto, esta associação não se observa ao nível do efetivo. Ainda para mais, foram observados baixos limiares de BHB e AGNE em associações positivas sugerindo que, vacas altas produtoras de leite têm maiores níveis de corpos cetónicos no início da lactação. A associação positiva entre cetose subclínica e a produção de leite, que se observou em amostras recolhidas na segunda semana após o parto, corrobora o fato de que as vacas que desenvolvem cetose subclínica na primeira semana após o parto têm uma produção de leite menor do que aquelas que desenvolveram após a primeira semana de lactação. Em suma, é difícil analisar a associação entre a produção de leite e a cetose subclínica, quanto mais altas as concentrações de corpos cetónicos, no início da lactação, maiores serão as perdas na produção de leite, mas quanto maior a produção da vaca maior o risco de sucumbir à cetose (Duffield *et al.*, 2009; Raboisson *et al.*, 2014).

A correlação do aumento da percentagem de gordura e a diminuição da percentagem de proteína no leite, com o aumento da concentração de corpos cetónicos, já foi várias vezes relatada e são dois parâmetros que se alteram nas vacas com cetose. O teor butírico aumenta nas vacas com cetose, o que se deve ao aumento da disponibilidade de BHB e de AGNE, para a síntese de matéria gorda do leite. O teor proteico diminui devido à diminuição de aporte energético, sendo é proporcional ao balanço energético. (Duffield *et al.*, 2009).

2.5.1 Cetose subclínica e consequências na reprodução

De acordo com a literatura, a cetose está associada à diminuição das performances reprodutivas da vaca leiteira. Verificou-se o aumento da ocorrência de quistos ováricos em vacas com cetose, o que pode ser atribuído a baixa disponibilidade energética durante o NEB. Isto, não só suprime a secreção pulsátil de LH como também reduz a resposta ovárica ao LH. Se o período de NEB for alargado, pode atrasar a primeira ovulação e a reentrada no ciclo éstrico. Foi observado, em vários estudos, que a quantidade de vacas que recomeçaram a ciclar no pós parto foi menor nos grupos onde existia cetose (Shin *et al.*, 2015).

A questão da associação da cetose com o intervalo entre o parto-inseminação fecundante é dúbia. Segundo Shin *et al.* (2015), a probabilidade da vaca ficar gestante após a primeira inseminação não tem a ver com a cetose. No entanto, outros artigos relatam que existe associação entre as concentrações de BHB durante as primeiras 3 semanas após o parto e o aumento do intervalo entre parto e fecundação (Cooper 2014).

Contudo, a associação da performance reprodutiva com a cetose subclínica ainda não foi intensivamente estudada e, devemos ter em conta que, as performances são afetadas também pelo déficit energético prolongado (Cooper 2014; Raboisson et al., 2014).

2.5.2 Cetose e supressão do sistema imunitário

Em situações de cetose, o sistema imunitário é menos eficaz, uma vez que ocorre a diminuição dos níveis sanguíneos de leucócitos e neutrófilos e da sua capacidade fagocitária, bactericida e quimiostática. Para além disso, a produção de citocinas, que permitem o recrutamento e a ativação de outras células imunitárias, é também insuficiente (Suriyasathaporn 2000). As altas concentrações de AGNE e BHB induzem a imunossupressão que, por sua vez, é o maior componente das patologias inflamatórias do trato reprodutivo (LeBlanc et al., 2012).

2.5.3 Cetose associada a patologias

2.5.3.1 Deslocamento do abomaso

A correlação entre o deslocamento do abomaso e a cetose é bastante estudada e controversa. Sabe-se que a adaptação ao NEB é um fator chave na patogénese do deslocamento do abomaso, ou seja, as concentrações de AGNE e BHB estão associadas ao risco de um eventual deslocamento (LeBlanc *et al.*, 2005).

LeBlanc *et al.* (2005), demonstrou que uma concentração de BHB superior a 1000 μ mol/L e o aumento da concentração sanguínea de AGNE podem promover o deslocamento do abomaso. Mais especificamente, Herdt (2000) mostrou que as vacas com uma concentração no sangue de BHB superior a 1400 μ mol/L, nas duas primeiras semanas de lactação, têm três vezes mais hipóteses de vir a desenvolver para além da cetose, deslocamento do abomaso (Shin *et al.*, 2015)

2.5.3.2 Patologias uterinas

Segundo vários estudos observou-se que patologias uterinas ocorridas após o parto, incluindo metrite e endometrite, estão associadas à redução da ingestão alimentar e consequentes NEB e imunossupressão. No entanto, há uma grande discrepância nos variados estudos que tentam correlacionar a endometrite clínica e subclínica com a cetose (Shin *et al.*, 2015).

2.5.4 Perdas económicas associadas à cetose

O impacto económico provocado pela cetose (clínica e subclínica) pode ser substancial. No entanto, a cetose subclínica comporta perdas económicas mais importantes do que a cetose clínica, como demonstrou Geishauser *et al.*(2001), essas perdas são resultado da diminuição da

produção de leite, da alteração da sua composição, de problemas reprodutivos e do aumento da taxa de refugo (Cooke et al., 2001).

O mesmo estudo previu perdas económicas associadas à cetose subclínica de 78 dólares, por vaca e por lactação, tendo em conta a diminuição da produção de leite, o aumento do intervalo parto – fecundação e o aumento do risco do desenvolvimento de patologias como cetose clínica e deslocamento do abomaso. As perdas económicas dos casos de cetose clínica são de 145 dólares por vaca afetada, tendo em conta o preço dos tratamentos veterinários, a diminuição da produção leiteira, o aumento do intervalo parto-fecundação e mortalidade (Geishauser *et al.*, 2001; Cooper 2014).

2.6 Epidemiologia

2.6.1 Taxa de prevalência e taxa de incidência

A taxa de prevalência de uma patologia é o número total de casos dentro de uma população. No caso da cetose, as diferenças da prevalência entre efetivos são muito evidentes na prática clínica e na literatura, com algumas explorações leiteiras a apresentarem uma ocorrência insignificante. A prevalência depende das características dos testes utilizados (sensibilidade e especificidade), dos limiares seleccionados, do momento de recolha das amostras e da frequência. Posto isto, segundo Smith (2008), a taxa de prevalência da cetose clínica varia entre 3% e 22% e da cetose subclínica entre 31% e 41%.

A taxa de incidência de uma doença corresponde ao número de novos casos dentro de uma população e num determinado período de tempo. A taxa de incidência, segundo Smith (2008) varia entre 1,87% e 13% para a cetose clínica e 7.3% a 12,1% para a cetose subclínica. Utilizaram, em alguns estudos, novos testes de detecção de corpos cetónicos e para valores de BHB entre 1200 e 1400mmol/L, a incidência da cetose subclínica já variava entre 43% e 59% (Suthar *et al.*, 2013).

É interessante observar, que os produtores de explorações mais pequenas tendem em superestimar a incidência de cetose clínica e produtores de explorações maiores tendem a subestimar esses valores. É, por isso, essencial tomar decisões clínicas baseadas na avaliação da prevalência da cetose subclínica do efectivo, ao invés de admitir a percepção do produtor na incidência da cetose clínica (Oetzel 2004). Devemos ter em conta que, numa exploração, mais do que 10% das vacas com cetose subclínica é considerada uma forte evidência de um problema ao nível da exploração e deverá ser revisto o manejo nutricional (Herdt 2014).

2.6.2 Epidemiologia

A doença ocorre no período imediato *postpartum*, com 90% dos casos ocorrendo nos primeiros 60 dias de lactação. Independentemente da etiologia específica, ocorre mais comumente durante o primeiro mês de lactação, com menor frequência no segundo mês, e apenas ocasionalmente no final da gravidez. O tempo médio para início, após o parto, varia de 10 a 28 dias e há um pico de prevalência e incidência entre a segunda e a terceira semana. Verifica-se um risco acrescido se o intervalo entre partos for prolongado (Radostits *et al.*, 2010; Divers & Peek 2008).

A cetose ocorre principalmente em bovinos leiteiros e é predominante nos países onde é praticada a exploração intensiva, sendo rara em regimes extensivo e semi-intensivo. Ocorre principalmente em animais estabulados e apesar de serem descritas diferenças aparentes de incidência entre raças, a evidência para uma predisposição hereditária dentro das raças é mínima (Radostits *et al.*, 2010; Smith 2008)

Quanto aos fatores de risco que podem aumentar a prevalência e incidência, sabemos que existe baixa prevalência da cetose nas vacas primíparas, aumentando a partir da quarta lactação. Segundo Santschi *et al.* (2011), estudo realizado no Canadá através da detecção de BHB existente no leite por infra-vermelhos, a taxa de prevalência para primíparas é de 20,4% e para múltiparas é de 25,7%.

No entanto, a relação mais consistente dos estudos publicados é o aumento da incidência da cetose em vacas com condição corporal elevada ao parto. Gillund *et al.* (2001), demonstrou que o risco de cetose em vacas com condição igual ou superior a 3,5 possuem um risco 2 vezes maior, de contrair cetose, do que as vacas com condição corporal menor ou igual a 3,25 (Gillund *et al.*, 2001).

2.7 Métodos de diagnóstico

Devido às consequências econômicas inerentes à cetose subclínica, a detecção das vacas com este distúrbio é importante, quer para tratamento individual quer para alterar o manejo dos animais. Os sinais clínicos da cetose são inespecíficos, mas os parâmetros bioquímicos estão alterados e torna-se necessário recorrer a exames complementares, para efetuar o diagnóstico.

Cetose clínica e subclínica resultam em hipoglicemia, hipercetonemia e presença de corpos cetônicos nos tecidos, urina e leite (Andrews *et al.*, 2004; Enjalbert *et al.*, 2001). Segundo os padrões estabelecidos (fig.3), nos animais com cetose clínica a concentração sanguínea de glucose varia entre 20 e 40mg/dL e de corpos cetônicos é de 30mg/dL. Já a concentração total de corpos cetônicos na urina é acima de 84mg/dL e no leite acima de 10mg/dL. Os animais com

cetose subclínica não apresentam sinais clínicos, no entanto, têm normo/hipoglicémia, concentração sanguínea de corpos cetônicos entre 10 e 30mg/dL e concentração no leite de corpos cetônicos de 2mg/dL (Smith 2008).

Dos três corpos cetônicos existentes, o β -Hidroxibutirato do plasma ou soro é o melhor parâmetro de pesquisa de cetose, uma vez que é o predominante em circulação. As concentrações plasmáticas de BHB têm uma correlação positiva com as concentrações plasmáticas do acetoacetato, mas este tende a ser mais instável e difícil de detetar nas amostras. Posto isto, as concentrações plasmáticas de BHB, em vacas saudáveis, são inferiores a 1000 μ mol/L (Smith 2008). Vários autores utilizam o valor limite de 1200 μ mol/L, para discriminar as vacas saudáveis das vacas com cetose subclínica (Enjalbert *et al.*, 2001) e 3000 μ mol/L para as vacas com cetose clínica (Smith 2008).

Para além disso, os níveis plasmáticos de glicerol e AGNE estão também elevados, bem como Aspartato Aminotransferase (AST) e o Sorbitol Desidrogenase (SDH). Estes parâmetros demonstram o grau de disfunção hepática em casos de lipidose hepática, indicam o risco de haver cetose e podem complementar os restantes métodos de diagnóstico (Smith 2008).

2.7.1 Diagnóstico epidémico-clínico

Numa primeira abordagem, o diagnóstico da cetose é baseado na história do animal, no conhecimento epidemiológico e achados clínicos.

O diagnóstico epidemiológico é fundamentado pela existência de casos clínicos idênticos, pela presença dos fatores de risco acima enumerados e pela análise dos dados da exploração. Assim, suspeitamos de cetose em vacas multíparas, altas produtoras, em vacas de explorações com manejo inadequado. É possível também inferir o tipo de cetose com base nestes parâmetros, por exemplo, se a suspeita ocorrer nas primeiras duas semanas após o parto poderá tratar-se de cetose do tipo II, mas se estiver no pico da lactação já se trata de cetose do tipo I.

O diagnóstico clínico apoia-se nos sinais clínicos encontrados. Em vacas geralmente, no início de lactação com uma queda repentina da produção de leite; com alguma perda de peso; com relutância a comer concentrados; com temperatura, pulsação e frequência respiratória normais, tal como os movimentos do rúmen. Também é possível identificar o odor característico no ar expirado, leite e urina.

É importante a diferenciação entre cetose primária e cetose secundária e, por isso, realizar um exame físico completo. Muitos casos são apresentados como cetose, mas na verdade são casos de deslocamento de abomaso e algumas vacas com hipocalcémia têm também cetose.

Uma vez que a cetose tem um carácter inespecífico, existem vários diagnósticos diferenciais, como o deslocamento do abomaso, reticulite traumática, indigestão primária, cistite, pielonefrite ou *diabetes mellitus*. No caso da cetose nervosa devemos descartar listeriose, hipomagnesiemia, raiva e encefalopatia espongiforme bovina (BSE) (Andrews *et al.*, 2004; Smith 2008).

2.7.2 Métodos de diagnóstico laboratoriais

2.7.2.1 Testes sanguíneos

O teste de excelência para o diagnóstico de cetose é a medição da concentração de BHB no soro ou plasma (Duffield *et al.*, 2009). Este exame complementar é indicado para a pesquisa de cetose em vacas suspeitas, para a avaliação da saúde geral do efetivo e para a monitorização do manejo alimentar. No entanto, este teste requer amostras de sangue que são depois enviadas para um laboratório, onde são processadas (Iwersen *et al.*, 2009).

As amostras de sangue não devem ser recolhidas a partir da veia mamária. Nestas circunstâncias podemos obter concentrações de BHB menores, do que se fosse recolhido a partir da veia jugular ou coccígea, uma vez que o úbere tende a extrair o BHB e a libertar o acetoacetato.

Uma vez que as concentrações de BHB aumentam após a refeição, foi sugerido recolher amostras 4 a 5h após o início da refeição, para capturar o pico de concentração de BHB. Este pico pós-refeição, no soro, ocorre devido ao aumento da produção ruminal de ácido butírico (Oetzel 2004; Enjalbert *et al.*, 2001).

2.7.3 Métodos de diagnóstico realizados diretamente na exploração

Existem diversos testes rápidos, exequíveis no campo, disponíveis para monitorização de cetose subclínica em efetivos leiteiros, a partir da urina, leite e sangue. Estes testes têm vários parâmetros que os tornam mais vantajosos e que permitem mitigar os inconvenientes dos testes laboratoriais, como: baixo custo, menor mão-de-obra e resultados imediatos. Isto faz com que sejam particularmente úteis para realizar ou excluir um diagnóstico clínico individual. No entanto, nenhum deles tem sensibilidade e especificidade ótimas comparando com os testes laboratoriais, que garantem precisão na investigação de cetose subclínica (Oetzel 2004; Iwersen *et al.*, 2009).

2.7.3.1 Testes da urina

A urina pode ser avaliada com testes executados na própria exploração. No entanto, recolher uma amostra de urina pode tornar-se numa tarefa morosa e normalmente não se

consegue obter urina de 100% das vacas selecionáveis e, para além disso, tem baixa especificidade.

O acetoacetato presente na urina pode ser avaliado quantitativamente com nitroprussiato de cianeto. Estes teste tem excelente sensibilidade mas baixa especificidade, mesmo assim é um teste bastante útil, uma vez que é preferível obter falsos positivos do que falsos negativos. Contudo, não é muito útil na monitorização de efetivos.

Segundo Oetzel (2004), o melhor teste para avaliar a cetose da urina consiste numa fita semiquantitativa que mede acetona e acetoacetato. Este teste tem muito boa especificidade, tendo também boa sensibilidade, comparado com testes sanguíneos para o BHB e com os restantes testes da urina.

2.7.3.2 *Testes do leite*

Os testes para a cetose, realizados a partir do leite, trazem grandes vantagens em relação aos testes da urina, pela facilidade de recolha e pela garantia de que todas as vacas selecionadas são testadas. No entanto, os testes do leite têm menos sensibilidade do que os testes da urina.

Os pós de nitroprussiato podem ser usados para testar qualitativamente o acetoactetao existente no leite, mas estes testes têm também baixa sensibilidade, comparando com os testes sanguíneos de BHB, e não são recomendados como testes de monitorização do efetivo. De qualquer forma, eles têm algum valor, embora limitado, para diagnóstico individual.

Segundo Oetzel, quando se usa o valor limite de 100 μ mol/L este teste tem 83% de sensibilidade e 82% de especificidade. Mas, para diagnóstico individual o valor limite de 50 μ mol/L aumenta a sensibilidade (89%) – melhor deteção de verdadeiros positivos -, no entanto a taxa de falsos positivos aumenta a 69%, sendo 60% a 100 μ mol/L. Para o valor limite de 200 μ mol/L a sensibilidade reduz para 54%, desta forma não deve ser utilizado para diagnóstico individual de cetose devido ao aumento de falsos positivos.

Conclui-se que os resultados dos testes sanguíneos são muito mais confiáveis para a monitorização da presença de cetose subclínica num efetivo. Os testes rápidos de medição do BHB do leite têm um valor limitado e, para além disso, não têm muita importância para todo o efetivo, como poderão ter para o diagnóstico individual de uma vaca que necessite de tratamento (Oetzel 2004).

2.7.3.3 *Testes rápidos do sangue*

Nos últimos anos, foram descritas as excelentes características dos medidores portáteis do BHB sanguíneo, inicialmente desenvolvidos para o mercado da medicina humana (Iwersen *et al.*, 2013).

No primeiro estudo em que foi utilizado um medidor eletrônico, nas vacas leiteiras, demonstraram uma alta correlação com as concentrações de BHB doseadas em laboratório e, portanto, foi considerado indicado para detetar cetose subclínica em vacas leiteiras (Iwersen *et al.*, 2009).

O sistema consiste num aparelho eletrônico e respetivas fitas eletroquímicas. Depois de inserir a fita na ranhura do aparelho, deve-se aplicar um pequeno volume de sangue (0,6 a 1,5 μL) na câmara da extremidade da fita. O BHB é oxidado a acetoacetato e gera-se uma corrente elétrica que é diretamente proporcional à concentração de BHB presente na amostra. Após 10 segundos a concentração de BHB é apresentada no ecrã em mmol/L. Segundo Iwersen *et al.* (2013), o teste realizado com o aparelho Precision Xtra é bastante útil e preciso na deteção de cetose subclínica. Foram verificadas excelentes características e uma boa performance de diagnóstico quando utilizado um valor limite de 1400 μmol de BHB/L no sangue (Iwersen *et al.*, 2009). Para este limite a sensibilidade é de 90% e a especificidade de 98%. Teremos, então, poucos falsos positivos (2%). Estes valores são bastante superiores aos dos testes realizados na urina ou leite (Oetzel 2004).

O estudo de comparação dos aparelhos GlucoMen LX Plus (GLX) e FreeStyle Precision (FSP) demonstrou que o FSP tem excelentes características comparando com os estudos realizados com o aparelho Precision Xtra. Já o GLX apresenta menor concordância com os testes laboratoriais, mas após um ajuste do valor limite para a cetose subclínica ($\geq 1400\mu\text{mol/L}$) foi, também, considerado adequado (Iwersen *et al.*, 2013).

2.7.4 Estratégias para avaliar a cetose subclínica no efetivo

Realizar testes em efetivos, para a cetose subclínica, requer estratégias bastante diferentes daquelas realizadas para a deteção da doença individualmente. Também a interpretação dos testes colectivos é muito diferente da interpretação dos resultados laboratoriais dos testes individuais. Neste último caso, os resultados são interpretados por comparação aos padrões estabelecidos, pelo laboratório que realizou o teste. Os padrões são frequentemente calculados a um intervalo de confiança de 95% em testes de 100 ou mais animais, clinicamente normais. Esta abordagem é útil para tomar decisões em vacas doentes, mas não é indicado para interpretar resultados de testes quando se trata de uma amostra de todo o efetivo. A interpretação dos testes, realizados no efetivo, requer uma compreensão de como os metabolitos afetam a performance dos animais, a monitorização da prevalência de doenças subclínicas e a incidência de patologias clínicas. Neste caso, é útil apenas quando a amostra compreende o número suficiente de animais do rebanho, para que o intervalo de segurança seja razoável e reflita a população em estudo. É difícil avaliar o grau de cetose subclínica que um efetivo possa

experienciar. Contudo, é importante desenvolver protocolos de monitorização da ingestão de alimento e efetuar medições de cetose nas vacas em início de lactação. A identificação precoce destas vacas permite o tratamento individual e alerta o produtor para problemas subjacentes à nutrição. A estratégia dos testes para a cetose subclínica é designada para identificar efetivos com muito alta ou muito baixa prevalência de cetose subclínica, ou seja, a intenção não é otimizar a alimentação das vacas em transição para a prevenção de cetose subclínica (Oetzel 2004).

2.7.5 Detecção de corpos cetónicos no Contraste Leiteiro

Como já foi referido, a cetose (clínica e subclínica) resulta de elevadas concentrações de corpos cetónicos no sangue, mas também no leite. Segundo Enjalbert *et al.* (2001), as concentrações de corpos cetónicos no sangue e no leite estão altamente correlacionadas. Contudo, do ponto de vista prático a deteção dos corpos cetónicos é muito mais simples no leite do que no sangue (Andrews *et al.*, 2004).

A implementação de um programa de monitorização de cetose subclínica, associado ao contraste leiteiro, que é efetuado mensalmente em cada exploração, poderá ser uma hipótese mais prática e menos exaustiva. A Análise por Injeção em Fluxo (FIA) (Gustafsson & Emanuelsson, 1996) e Espectrometria de Infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR) (Heuer *et al.*, 2001; Van Kneegsel *et al.*, 2010; Van der Drift *et al.*, 2012) são técnicas laboratoriais que têm sido desenvolvidas, para serem utilizadas no contraste leiteiro, e servem para medir as concentrações de BHB, acetona, gordura e proteína no leite (Oetzel 2004).

Este teste é rápido, comporta baixos custos e é fácil de implementar em larga escala. A exatidão do doseamento dos corpos cetónicos é suficiente para classificar vacas saudáveis e vacas em risco de contrair cetose e, também, de estabelecer a taxa de prevalência de um efetivo (Andrews *et al.*, 2004).

Segundo Oetzel (2004), este é o primeiro estudo que compara as concentrações de BHB e acetona no leite, determinadas por FIA, com as concentrações de BHB no sangue, doseadas com o aparelho Precision Xtra ou através de análises laboratoriais. Existem vários estudos que obtiveram sensibilidade maior que 80% e especificidade maior que 95%, sendo que, estes valores tendem a variar de estudo para estudo sempre que se utilizam diferentes métodos e valores limite.

Este método de diagnóstico e monitorização é bastante vantajoso porque, uma vez realizado no contraste leiteiro mensal, o produtor tem sempre acesso ao relatório e à listagem de vacas em risco de ter cetose e à taxa de prevalência do seu efetivo, desta forma, a

monitorização, tratamento e prevenção da cetose será muito mais eficaz. No entanto, existem também algumas limitações, visto que o teste se realiza uma vez por mês - o que poderá não ser suficientemente frequente -, há um lapso de tempo entre a recolha de amostras e a entrega dos resultados e há elevada percentagem de falsos positivos. Concluindo, este teste poderá não ser o suficiente para ser o único método de diagnóstico numa exploração leiteira e não é ideal para identificar vacas afetadas com cetose para tratamento imediato (Van Kneegsel *et al.*, 2010; Denis-Robichaud *et al.*, 2014).

3 Tratamento

Após o diagnóstico, existem numerosos tratamentos disponíveis para os animais afetados, que são muito semelhantes quer para a cetose, quer para a lipidose hepática. Contudo, em alguns animais a resposta é apenas transitória e em casos raros a doença pode persistir e causar a morte dos animais. No caso da cetose ser secundária, os animais não respondem satisfatoriamente ao tratamento e há necessidade de identificar, resolver a patologia primária e ao mesmo tempo corrigir o manejo alimentar (Adams 2014; Smith 2008; Radostits *et al.*, 2000).

Vários tratamentos têm sido utilizados para a cetose primária. A prioridade é compensar o NEB e existem três componentes fulcrais para um tratamento eficaz: (1) restaurar os níveis de glucose sanguínea, o mais rápido possível; (2) reabastecer o oxaloacetato, o intermediário essencial do ciclo de krebs no fígado, para que os ácidos gordos mobilizados dos depósitos de gordura sejam completamente oxidados - isto irá reduzir a taxa de produção de corpos cetónicos - e (3) aumentar a disponibilidade de precursores glucogénicos na dieta, principalmente ácido propiónico (Andrews *et al.*, 2004; Smith 2008; Adams 2014).

A curto prazo, os objetivos podem ser alcançados, utilizando a terapia tradicional, com a perfusão endovenosa de 100 a 500mL de glucose a 50%, que provoca um aumento transitório dos níveis de glucose – pode chegar a oito vezes a concentração normal logo após a administração, durante cerca de duas horas após a administração. Este estado transitório de hiperglicémia pode ter um impacto negativo na motilidade e função abomasal, tal como acontece com o excesso de corpos cetónicos. Para além disso, a glucose, que não é consumida, é excretada pelos rins, juntamente com os outros metabolitos, e assim pode levar a outros distúrbios eletrolíticos como hipocalémia, precipitando outras patologias.

Este tratamento deve ser acompanhado pela administração oral de precursores de glucose como propilenoglicol - 150mL duas vezes por dia -, combinado com cobalto, durante três a quatro dias. No caso de cetose nervosa, a perfusão de glucose é essencial e poderá ser

considerado como tratamento único (Andrews *et al.*, 2004; Adams 2014; Smith 2008; Gordon *et al.*, 2013).

As vacas leiteiras, no princípio da lactação, têm inerentemente resistência à insulina, que faz parte do complexo mecanismo de homeostase, para produzir grandes quantidades de leite durante o período de NEB. Animais com cetose têm ainda mais resistência à insulina comparando com animais saudáveis (Gordon *et al.*, 2013). Portanto, a insulina pode ser usada no tratamento devido aos seus efeitos anabólicos, ela facilita a captação de glicose e previne a perda de glicose via renal. Também promove a diminuição da mobilização de gorduras, aumenta a síntese de triglicerídeos e aumenta o consumo de corpos cetônicos como fonte energética, o que deverá diminuir as consequências da cetonemia. Porém, não deverá ser utilizada como tratamento único para cetose, uma vez que provoca hipoglicemia. Por isso, deverá ser combinada com glicose ou corticosteróides que promovem o aumento da glicemia (Adams 2014; Gordon *et al.*, 2013).

O propilenoglicol foi o primeiro tratamento descrito para a cetose e continua a ser utilizado. É conhecido pelos seus efeitos anti-cetogênicos, pelo aumento da concentração plasmática de glicose, pela diminuição dos níveis plasmáticos de AGNES e diminuição de triglicerídeos no fígado, o que resulta na diminuição de BHB plasmáticos (Gordon *et al.*, 2013; McArt *et al.*, 2011; Adams 2014).

O propilenoglicol é administrado por via oral (300g), uma vez por dia, durante cinco dias (Cooper 2014). Após a administração, chega ao rúmen e pode sofrer um de dois processos diferentes: (1) absorção ou (2) fermentação, pelo qual é convertido a propionato. Quando é absorvido diretamente, ele entra no ciclo de Krebs, para aumentar a oxidação de acetil-coA, e estimular a neoglucogênese. O propionato derivado da digestão do propilenoglicol também pode ser usado para a neoglucogênese – aumenta a concentração de glicose - e estimula a secreção de insulina. Há, então, um aumento significativo da liberação de insulina, quinze minutos após a administração, durante cerca de duas horas. Este pico de insulina permite diminuir a mobilização de gordura e a produção de corpos cetônicos pelo fígado (Gordon *et al.*, 2013; Adams 2014; McArt *et al.*, 2011).

Segundo McArt *et al.* (2011) a administração oral de PG tem efeitos bastante benéficos como a resolução da cetose, menor incidência de cetose clínica e, em alguns efetivos, aumento da produção de leite. No entanto, este último facto ainda tem evidências ambíguas, sendo que estudos revelam que há aumento da produção de leite quando é realizada a profilaxia com PG, enquanto outros estudos demonstram que a produção de leite diminui. Já no estudo de

Rukkwamsuk & Panneum a administração oral de PG não tem efeitos na produção de leite (McArt *et al.*, 2011; Rukkwamsuk & Panneum 2010).

A vitamina B12 tem sido utilizada, como adjuvante no tratamento da cetose, devido ao seu papel catalisador da neoglucogénese, uma vez que é um cofator essencial do ciclo de krebs. A vitamina B12 e o cobalto encontram-se diminuídos em vacas altas produtoras, no período periparto, o que é agravado em locais onde existe défice destes nutrientes, sendo essencial inserir na dieta. Para além disso, o fósforo é também essencial no metabolismo da glucose, mas ainda não se conhece em que formas está disponível no organismo. A vit. B12 e o fósforo, quando combinados, poderão vir a ser muito úteis no tratamento da cetose, no entanto, ainda não existem estudos suficientes que corrobore esta hipótese (Adams 2014; Gordon *et al.*, 2013).

Os glucocorticóides podem ser também um tratamento útil para a cetose e podem ser usados sozinhos ou em combinação com glucose, seguidos por administração oral de precursores glucolíticos. Estimulam o apetite, a neoglucogénese e a secreção de glucagon, pelo contrário, inibem a secreção de insulina e a captação de glucose nas células e a produção de leite (Adams 2014; Gordon *et al.*, 2013).

A terapia com glucocorticóides resulta na redução da formação de corpos cetónicos devido à utilização da acetil-coA, consequência da oxidação dos ácidos gordos, e aumenta os níveis de glucose devido ao aumento da disponibilidade de precursores glucolíticos no fígado. Os glucocorticóides mais comumente usados são a dexametasona, a betametasona e a flumetasona - todas são eficazes. Frequentemente é administrada uma única dose, mas geralmente acaba por haver recidivas dois ou três dias depois do tratamento, podendo ser repetida a dose. As desvantagens são a imunossupressão, a possibilidade de haver hiperglicémia e devem ser evitados em animais com esteatose hepática (Andrews *et al.*, 2004; Adams 2014).

4 Prevenção

É difícil fazer recomendações gerais para o controle da doença, devido às muitas condições em que ocorre, à provável etiologia múltipla e aos sistemas de alimentação que variam - desde aqueles que alimentam com os componentes separadamente, àqueles que alimentam com rações completas. No entanto, sabe-se que o controlo da cetose clínica está integralmente relacionado com a nutrição adequada da vaca durante o período seco e a lactação (Radostits *et al.*, 2000). O primeiro objetivo nutricional, durante o período de transição, é sustentar as adaptações metabólicas e deve ser encontrada a dieta ideal, para que as vacas não se apresentem demasiado gordas na altura do parto, nem subalimentadas (Esposito *et al.*, 2014; Radostits *et al.*, 2000).

A monensina tem sido usada como prevenção para a cetose, mas não está indicada para tratamento. É pertencente ao grupo dos antibióticos ionofóros e inibe as bactérias gram-positivas – produtoras de acetato e butirato. O seu efeito é aumentar a concentração de propionato já que as bactérias gram-negativas – produtoras de propionato e succinato - são resistentes à sua actuação (Adams 2014; McArthy *et al.*, 2015). Foi demonstrado que vacas suplementadas com monensina no período periparto têm maiores concentrações plasmáticas de glucose e menores de BHB o que resulta na diminuição da cetose subclínica (McArthy *et al.*, 2015).

A niacina tem uma grande importância no metabolismo uma vez que pode ser incorporada em coenzimas NAD⁺ e NADH. Quase todas as espécies são capazes de sintetizar estas vitaminas, nomeadamente microrganismos que existem no rúmen dos ruminantes, assim, estes animais têm uma concentração de niacina adicional disponível. No entanto, aquando a produção de leite, os requerimentos de niacina ultrapassam a sua síntese e vários estudos demonstraram os efeitos positivos da suplementação de niacina (Niehoff *et al.*, 2009). Foi verificado, após a ingestão de niacina, a diminuição da concentração no sangue de AGNE. Não se conhece ainda as vias envolvidas nas alterações da concentração de corpos cetónicos e no metabolismo da glucose. São necessários mais estudos para comprovar os efeitos benéficos da niacina (Niehoff *et al.*, 2009). Poderá ser mais útil em efetivos com elevada prevalência de cetose subclínica (Divers & Peek 2008).

O propilenoglicol é utilizado também para a prevenção da cetose clínica e subclínica administrado oralmente sete dias antes até sete dias depois do parto (Rukkwamsuk & Panneum 2010).

Quando se fala de prevenção de cetose é obrigatório considerar o conforto e bem-estar dos animais. Espaços para descansar e ruminar, infra-estruturas adequadas, bem como alimentação e a disponibilidade para realizar exercício físico são essenciais (Divers & Peek 2008).

5 Efeito da aplicação de bolus à base de colina e metionina para tratamento de cetose

Como já foi referido, a cetose é um distúrbio metabólico que pode ter grande impacto numa exploração leiteira pelos prejuízos económicos que provoca. Assim, no decorrer do estágio realizado na Cooperativa de Vila do Conde, decidimos realizar um trabalho prático de administração de bolus da gama Bolifast Physio (fig. 4) para tratamento de casos de cetose. Estes bolus consistem essencialmente em colina e metionina protegidas da degradação ruminal e em cada administração aplicam-se dois bolus: um efervescente de libertação imediata e o outro de libertação lenta e efeito prolongado. O propósito deste trabalho é verificar os efeitos da

administração de colina e metionina protegidas da degradação ruminal – durante as primeiras três semanas após o parto - na concentração sanguínea de BHB.

A colina [(CH₃)₃N+CH₂CH₂OH], também conhecida como trimetil etanolamina, é frequentemente referida como vitamina, no entanto, não se enquadra nas definições clássicas das vitaminas nem de cofatores enzimáticos. Para além disso, a sua síntese é endógena e é necessária em concentrações maiores do que as vitaminas (Santos & Lima 2007; Grummer 2012). Porém, é o composto chave na síntese da fosfatidilcolina e da acetilcolina. A primeira é o principal fosfolípido dos ruminantes e é essencial na constituição de todas as membranas celulares, na absorção e transporte de lípidos, na sinalização celular e na síntese de lipoproteínas. A segunda molécula é um importante neurotransmissor.

A colina também pode ser sintetizada no fígado a partir da metionina proveniente da dieta (Santos & Lima 2007). A metionina também é um precursor da apolipoproteína B-100 no fígado (Grummer 1993) e dador de grupos metilo necessários para a síntese de fosfolípidos - componentes essenciais das VLDL. Durante 30 anos, tem sido especulado o papel da metionina no metabolismo da cetose (Esposito et al., 2014).

No que diz respeito à nutrição dos ruminantes, a colina é considerada como nutriente não essencial, contudo é exaustivamente degradada no rúmen e pouca concentração continua disponível no intestino delgado para absorção. Alguns estudos concluíram que, durante a lactação, a síntese endógena de colina não é suficiente para suprir as suas necessidades e deverá ser suplementada (Grummer 2012; Santos & Lima 2007; Hartwell *et al.*, 2000).

Em suma, sabendo que a síntese ativa de fosfatidilcolina é essencial para a síntese hepática e secreção de VLDL (responsáveis pelo transporte de triglicéridos) e nos ruminantes a sua produção é limitada, conseqüentemente estes animais são predispostos a desenvolver esteatose hepática (Grummer 2012; Santos & Lima 2012; Cooke *et al.*, 2007). E existem algumas evidências que demonstram este facto após a administração de colina protegida da degradação ruminal (RPC): (1) redução da esteatose hepática (Cooke et al., 2007); (2) aumento da expressão do gene para a proteína microssomal de transferência de triglicéridos (MTTP) – importante para a síntese de VLDL (Goselink *et al.*, 2012). E tem sido sugerido que a excessiva acumulação de triglicéridos no fígado poderá contribuir para o aumento da susceptibilidade do animal para contrair cetose, isto poderá ser consequência do comprometimento do metabolismo dos hidratos de carbono, bem como da neoglucogénese das vacas com esteatose hepática (Zahra *et al.*, 2006).

De encontro com o objetivo pretendido, fizemos pesquisa de cetose subclínica e clínica nos animais cujo parto tenha ocorrido nos últimos vinte e um dias, durante as visitas e consultas

nas explorações e, para além disso, procuramos nos relatórios do contraste leiteiro, das explorações associadas à Cooperativa Agrícola de Vila do Conde, as vacas com risco elevado de cetose. De seguida, efetuamos medições de BHB no sangue recolhido da veia coccígea, no dia 1 – dia da administração - e no dia 8, para tal utilizamos o aparelho Glucomen® LX Plus e o valor mínimo aplicado foi 1.2mmol/L.

Ao todo, foram realizadas medições em 8 explorações, num total de 38 vacas e a média de concentração de BHB sanguíneo foi de 0.6. Os bolus foram, finalmente aplicados em três explorações diferentes, da região de Vila do Conde. Em cada uma das explorações foram utilizadas duas vacas leiteiras com cetose – Holstein Frisian – uma para tratamento e outra para controlo.

	Exploração A		Exploração B		Exploração C	
	Vaca 1	Vaca1C	Vaca 2	Vaca 2C	Vaca 3	Vaca 3C
Intervalo Parto – Administração	30 dias	28 dias	30 dias	30 dias	9 dias	12 dias
Concentração BHB no dia 1	3.2mmol/L	0,7mmol/L*	2.4mmol/L	1.9mmol/L	5.3mmol/L	2.7mmol/L
Concentração de BHB no dia 8	3mmol/L	0,4mmol/L	0.7mmol/L	2.1mmol/L	1.7mmol/L	2.6mmol/L
Diferença	0.2mmol/L	0.3mmol/L	1.7mmol/L	0.2mmol/L	3.6mmol/L	0.1mmol/L
Outros tratamentos	Neatox, 1L de soro glucosado e cetosil durante 4dias	Neatox, 1L de soro glucosado e cetosil durante 4dias	Neatox, 1L de soro glucosado e cetosil durante 4dias	Cetosil durante 4dias	Neatox e 2 bolus de niacina	2 bolus de Niacina
Observações			DAE		DAE	Metrite

Tabela dos resultados obtidos – Foram realizados ensaios em três explorações – A, B e C. A cada uma correspondem duas vacas, sendo que a vaca com a letra “C” associada ao número corresponde à vaca controlo.

*foi aceite este valor mais baixo do que o padrão mínimo estabelecido, uma vez que este animal tinha sido tratado, com o tratamento descrito na tabela, para cetose uma semana antes da medição. Ou seja, embora sem medição, foi diagnosticada cetose clínica.

No entanto, devo enfatizar que há diversos fatores limitantes que interferem na consideração dos fatos. O trabalho prático foi concretizado na primeira metade do estágio – durante dois meses – e, por isso, não houve o acompanhamento adequado dos casos, ou seja, foram realizadas poucas medições após a administração dos bolus; e a amostra que foi possível obter é demasiado pequena. Para além disso - e uma vez que a cetose está altamente associada

a outras doenças como deslocamento do abomaso, cetose clínica e metrite (Duffield *et al.*, 2009) -, encontramos variáveis que impedem de correlacionar com clareza: (1) na exploração A, na vaca controle já tinha sido diagnosticada e tratada a cetose clínica há uma semana; (2) nas explorações B e C, ambas as vacas, às quais foram administrados os bolus, tinham deslocamento do abomaso à esquerda e foram aplicados outros tratamentos e (3) a vaca controle da exploração C tinha metrite.

Segundo a literatura, a RPC é utilizada como medida preventiva da esteatose hepática e da cetose no período periparto e pode promover a produção de leite e os parâmetros reprodutivos (Rovers 2014). Os benefícios de administração de RPC na incidência de patologias foram observados quando aplicada antes e após o parto, mas não quando utilizada apenas antes do parto. Isto sugere que a suplementação será mais importante durante o NEB, quando há grande mobilização de gordura, possivelmente porque promove o aumento da produção de VLDL e o metabolismo lipídico (Lima *et al.*, 2011).

Num estudo realizado por Rovers (2014), em que a RPC era aplicada apenas após o parto, concluíram que, após 90 dias, as vacas tratadas tinham 15% menos cetonúria do que as vacas controle. Também Oelrichs *et al.* (2004) observou a diminuição da concentração plasmática de BHB em conjunto com o aumento da DMI e diminuição da concentração plasmática de AGNE. Por oposição, variados estudos demonstraram que a RPC não exerce efeito na concentração plasmática de BHB, sugerindo que não afeta a cetogênese hepática apesar da diminuição da concentração de AGNE (Cooke *et al.*, 2007; Hartwell *et al.*, 2000; Piepenbrink & Overton 2002; Zahra *et al.*, 2006).

Concluindo, na literatura ainda existem resultados muito diversos e seriam necessários mais estudos para inferir o efeito da colina e da metionina na concentração do BHB sanguíneo. Relativamente ao trabalho prático realizado, não é possível retirar conclusões óbvias, no entanto, poderá ser útil como estudo preliminar para ensaios futuros no âmbito da Cooperativa Agrícola de Vila do Conde.

Bibliografia

- Adams J (2014) "Metabolic disease in farm cattle: part one – ketosis and fatty liver" **Veterinary Times**.
- Andrews, AH, Blowey RW, Boyd H (2004) "Major Metabolic Disorders" **Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle**, 2^o ED, 793-796.
- Brugere-Picoux J (1995) "Baisse de la disponibilité en glucose" **Maladies métaboliques de la vache laitière et biochimie clinique**, La dépêche technique, 46, 9-16.
- Butler ST, Marr AL, Pelton SH, Radcliff RP, Lucy MC, Butler WR (2003) "Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A" **Journal of Endocrinology**, 176, 205-217.
- Cooke RF, Silva del Río N, Caraviello DZ, Bertics SJ, Ramos MH, Grummer RR (2007) "Supplemental Choline for Prevention and Alleviation of Fatty Liver in Dairy Cattle" **Journal of Dairy Science**, 90(5), 2413–2418.
- Cooper R (2014) "Ketosis in dairy cattle" **MA Health Care Ltd**, vol. 19, no. 2, 74-82.
- Denis-Robichaud J, Dubuc J, Lefebvre D, DesCôteaux L (2014) "Accuracy of milk ketone bodies from flow-injection analysis for the diagnosis of hyperketonemia in dairy cows" **Journal of Dairy Science**, 97, 3364–3370.
- Divers TJ, Peek SF (2008) "Metabolic Diseases" **Rebhun's Diseases of Dairy Cattle**, 2^o Ed, 590-605
- Drackley JK (1999) "Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier?" **Journal of Dairy Science**, 82, 2259-2273.
- Drackley JK, Overton TR, Douglas GN (2001) "Adaptations of Glucose and Long-Chain Fatty Acid Metabolism in Liver of Dairy Cows During the Periparturient Period" **Journal of Dairy Science**, 84 (E. Suppl.), E100-E112.
- Duffield TF, Lissemore KD, McBride BW, Leslie KE (2009) "Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production" **Journal of Dairy Science**, 92(2), 571-580.
- 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.
- Esposito G, Irons PC, Edward CW, Chapwanya A (2014) "Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows" **Animal Reproduction Science**, 144, 60-71.
- Geishauser T, Leslie K, Duffield T (2001) "Monitoring subclinical ketosis in dairy herds" **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, 23(8), S65-S72.
- Gillund P, Reksen O, Gröhn YT, Karlberg K (2001) "Body Condition Related to Ketosis and Reproductive Performance in Norwegian Dairy Cows" **Journal of Dairy Science**, 84(6), 1390-1396.
- Gordon JL, LeBlanc SJ, Duffield TF (2013) "Ketosis Treatment in Lactating Dairy Cattle" **Veterinary Clinica of North America: Food Animal Practice**, vol 29, 433-445.
- Goselink RMA, van Baal J, Widjaja HCA, Dekker RA, Zom RLG, de Veth MJ, van Vuuren AM (2013) "Effect of rumen-protected choline supplementation on liver and adipose gene expression during the transition period in dairy cattle" **Journal of Dairy Science**, 96, 1102–1116.

- Grummer RR (1993) “Etiology of Lipid-Related Metabolic Disorders in Periparturient Dairy Cows” **Journal of Dairy Science**, 76, 3882-3896.
- Grummer RR (2012) “Choline: A Limiting Nutrient for Transition Dairy Cows” **Department of Animal Science, University of Wisconsin-Madison**, 27-32.
- Hartwell JR, Cecava MJ, Donkin SS (2000) “Impact of dietary rumen undegradable protein and rumen-protected choline on intake, peripartum liver triacylglyceride, plasma metabolites and milk production in transition dairy cows” **Journal of Dairy Science**, 83, 2907-2917.
- Herdt TH (2014) “Overview of Ketosis in Cattle” **The Merck Veterinary Manual**.
- Herdt TH (2000) “Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver” **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, 16(2), 215-230.
- Herdt TH, Gerloff BJ (2009) “Fatty Liver in Dairy Cattle” **Food Animal Practice**, 5^o Ed, 146-149.
- Herdt TH, Gerloff BJ (2009) “Ketosis” **Food Animal Practice**, 5^o Ed, 141-144.
- 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” **J Journal of Dairy Science**, 96, 7719-7730.
- Iwersen M, Falkenberg U, Voigtsberger R, Forderung D, Heuwieser W (2009) “Evaluation of an electronic cowside test to detect subclinical ketosis in dairy cows” **Journal of Dairy Science**, 92, 2618–2624.
- Janovick NA, Boisclair YR, Drackley JK (2011) “Prepartum dietary energy intake affects metabolism and health during the periparturient period in primiparous and multiparous Holstein cows” **Journal of Dairy Science**, 94, 1385–1400.
- Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (2008) “Lipids and ketones” **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 6^o Ed, 81-116.
- Le Bars D (1991) “Interrelations entre glycogénèse et lipogénèse chez les ruminants” **Académie Vétérinaire de France**, 64, 193-206.
- LeBlanc SJ, Duffield T, Leslie K (2005) “Metabolic predictors of abomasal displacement in lactating dairy cattle” **Journal of Dairy Science**, 88(1), 159-170.
- Lima FS, Sa Filho MF, Creco LF, Santos JEP (2011) “Effects of feeding rumen-protected choline on incidence of diseases and reproduction in dairy cows” **The Veterinary Journal**, 193(1),140-145.
- Lucy MC, Butler ST, Gaverick HA (2014) “Endocrine and metabolic mechanisms linking postpartum glucose with early embryonic and foetal development in dairy cows” **The Animal Consortium**, 8, 82-90.
- McArt JAA, Nydam DV, Oetzel GR (2012) “Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle” **Journal of Dairy Science**, 95, 5056–5066.
- McArt JAA, Nydam DV, Ospina OA, Oetzel GR (2011) “A field trial on the effect of propylene glycol on milk yield and resolution of ketosis in fresh cows diagnosed with subclinical ketosis” **Journal of Dairy Science**, 94, 6011-6020.
- McCarthy MM, Yasui T, Ryan CM, Pelton SH, Mechor GD, Overton TR (2015) “Metabolism of early-lactation dairy cows as affected by dietary starch and monensin supplementation” **Journal of Dairy Science**, 98, 3351-3365.
- McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA, Sinclair LA, Wilkinson RG (2011) “Metabolism” **Animal nutrition**, 7^o Ed, 192-234.

- Niehoff ID, Hüther L, Lebzien P (2009) "Niacin for Dairy Cattle: a review" **British Journal of Nutrition**, 101, 5-19.
- Oelrichs WA, Lucy MC, Kerley MS, Spain JN (2004) "Feeding soybeans and rumen-protected choline to dairy cows during the periparturient period and early lactation: Effects on reproduction" **Journal of Dairy Science**, 87(Suppl. 1), 344.
- Oetzel GR (2007) "Herd-Level Ketosis – Diagnosis and Risk Factors" **Preconference Seminar 7C: Dairy Herd Problem Investigation**, American Association of Bovine Practitioners, 40th Conference.
- Oetzel GR (2004) "Monitoring and testing dairt herds" **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, 20, 651-674.
- Piepenbrink MS, Overton TR (2003) "Liver metabolism and production of cows fed increasing amounts of rumen-protected choline during the periparturient period" **Journal of Dairy Science**, 86, 1722-1733.
- Raboisson D, Mounié M, Maigné E (2014) "Diseases, reproductive performance, and changes in milk production associated with subclinical ketosis in dairy cows: A meta-analysis and review" **Journal of Dairy Science**, 97, 7547–7563.
- Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW (2000) "Metabolic diseases" **Veterinary Medicine: A textbook of the Diseases of cattle, sheep, pigs and horses**, 9^o Ed, 1452-1468.
- Rovers M (2014) "Ketosis in Dairy Cows and the Role of Choline" **Orffa/Excentials**, 60-62.
- Rukkwamsuk T, Panneum S (2010) "Effect of oral administration of propylene glycol during periparturient period on blood biochemical parameters and liver triacylglycerol accumulation in postparturient dairy cows" **African Journal of Agricultural Research**, vol. 5(23), 3239-3245.
- Rukkwamsuk T, Wensing T, Geelen MJH (1998) "Effect of overfeeding during the dry period on regulation of adipose tissue metabolism in dairy cows during the periparturient period" **Journal of Dairy Science**, 81, 2904-2911.
- Santos JEP, Lima FS (2007) "Feeding Rumen-Protected Choline to Transition Dairy Cows" **Department of Animal Science, University of Florida**, 149-159.
- Santschi DE, Moore RK, Lefebvre DM (2011) "Prevalence of subclinical ketosis detected by near infra-red analysis of BHN in DHI milk samples" **Journal of Dairy Science**, 92, E-Suppl. 2/ **Journal of Dairy Science**, 97, E-Suppl.1.
- Shin EK, Jeong JK, Choi IS, Kang HG, Hur TY, Jung YH, Kim IH (2015) "Relationships among ketosis, serum metabolites, body condition, and reproductive outcomes in dairy cows" **Theriogenology**, 1-9.
- Smith BP (2008) "Endocrine and metabolic diseases" **Large Animal Internal Medicine**, 5^o Ed, 1233-1265.
- Suriyasathaporn W, Heuer C, Noordhuizen-Stassen E, Schukken YH (2000) "Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review" **Veterinary Research**, 31(4), 397-412.
- 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, 2925-2938.
- Van Knegsel ATM, van der Drift SGA, Horneman M, de Roos APW, Kemp B, Graat EAM (2010) "Short communication: Ketone body concentration in milk determined by Fourier transform infrared spectroscopy: Value for the detection of hyperketonemia in dairy cows" **Journal of Dairy Science**, 93, 3065–3069.
- Zahra LC, Duffield TF, Leslie KE, Overton TR, Putnam D, LeBlanc SJ (2006) "Effects of Rumen-Protected Choline and Monensin on Milk Production and Metabolism of Periparturient Dairy Cows" **Journal of Dairy Science**, 89, 4808–4818.

Anexo I

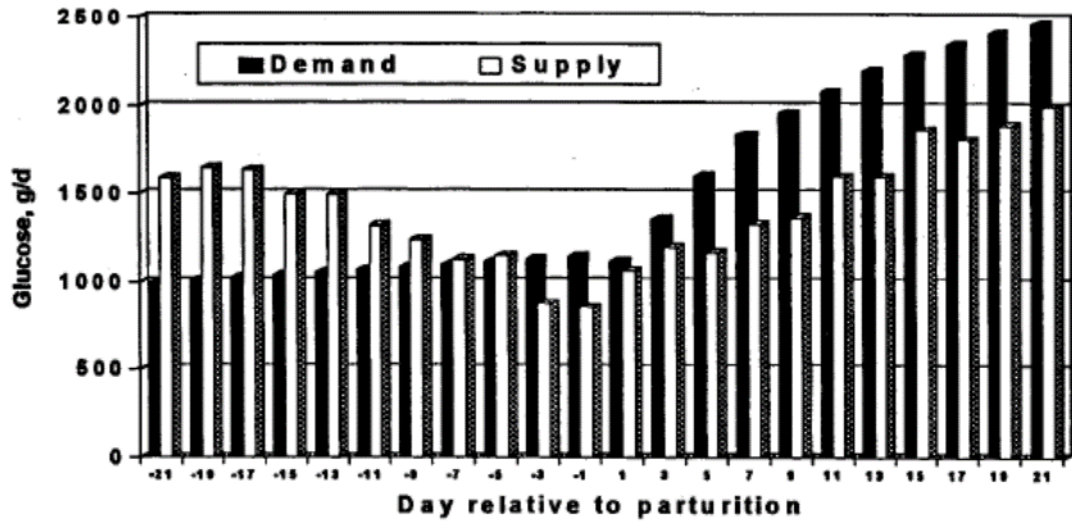


Fig. 1– Comparação entre a necessidade, estimada, de glucose com a glucose fornecida pela circulação esplênica, no período periparto. As vacas, referentes ao estudo, foram alimentadas *ad libitum* durante o período seco.

(Drackley *et al.*, 2001)

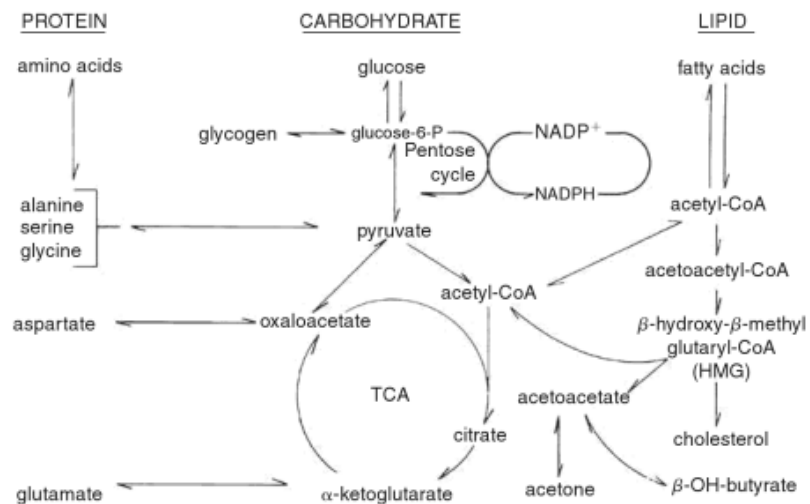


Fig. 2– Correlação entre os metabolismos dos HC, dos lípidos e das proteínas

(Kaneko *et al.*, 2008)

Anexo II

TABLE 41-8

Blood, Urine, and Milk Analysis in Ketosis

	Normal		Subclinical		Clinical	
	(mg/dL)	(mmol/L)	(mg/dL)	(mmol/L)	(mg/dL)	(mmol/L)
Blood glucose	52	(2.86)	28	1.54		
FFA	3				33	
Ac	0				15.1	0.26
AcAc	0	<0.35		0.36-1.05	4.4	>1.05, 0.5
BHB	10.7	(1.08)	>10	0-1.5	23.5	>1.5
TOTAL	3; 6.1		10-30		>30; 41; 48	5
Urine Ac	1	(0.17)			22	3.78
AcAc	3.4	(0.35)			37.3	3.80
BHB	11.7	(1.18)			25.1	2.54
TOTAL	9.54; 16.1				89; 305.77	
Milk Ac	0			0.17-0.25; 0.4	16.2	>1-2
AcAc	0				1.6	0.16
BHB	4.9	(0.49)			7.9	0.80
TOTAL	4.9		2		27.5; 37.35	

Ac, Acetone; AcAc, acetoacetic acid; BHB, β -hydroxybutyric acid; FFA, free fatty acid.

Fig. 3 – Valores dos parâmetros bioquímicos associados à cetose.

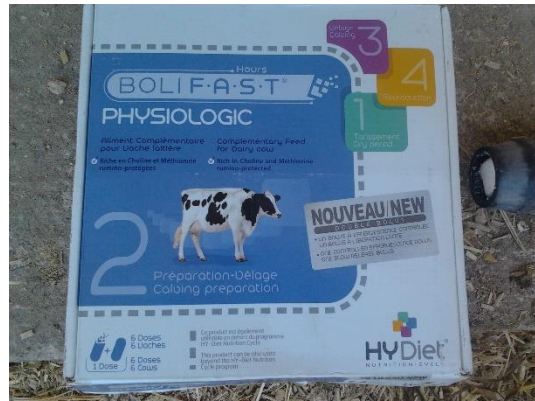


Fig. 4 e 5 – Bolus Bolifast Physiologic e aplicador utilizados no trabalho prático.

Anexo III

Área de intervenção	Patologia/Procedimento	Número de casos
Medicina	Pneumonia	12
	Patologias podais	2
	Animal em decúbito	9
	Mamite de aguadilha	4
	Cetose	5
	Úlcera abomasal	2
	Peritonite	1
	Consulta de acompanhamento	5
	Enterite	6
	Fratura/Luxação	1
	Hipocalcémia	4
	Ruptura de ligamentos/Laceração	3
	Orquite	1
	Eutanásia	2
	Acompanhamento	5
Prolapso uterino	1	
Cirurgia	Fibrose do teto	1
	Deslocamento do abomaso à esquerda	8
	Deslocamento do abomaso à direita	2
	Laparoscopia exploratória	2
Reprodução	Cesariana	1
	Distócia	2
	Retenção placentária	3
	Metrite	1

Tabela 1 – Casuística relativa ao estágio realizado na Cooperativa Agrícola de Vila do Conde.

Área de intervenção	Número de explorações
Sanidade	12
Prova de estábulo	14
Diagnósticos de gestação	12

Tabela 2 – Casuística relativa ao estágio realizado em Vila do Conde. As atividades de controlo de sanidade, da qualidade do leite e reprodução é apresentado por número de explorações.

Área de intervenção	Patologia/Cirurgia	Numero de casos			
		Bovinos adultos	vitelos	Ovinos adultos	Cordeiros
Medicina	Mielite ascendente	0	0	0	2
	Ataxia	0	0	2	0
	Infecção urinária	0	0	1	1
	Sépticémia	1	5	0	2
	Enterite	2	21	2	7
	Colocação de arganel	1	0	0	0
	Artrite	0	6	1	4
	Toxémia de gestação	0	0	1	0
	Patologias podais	1	0	1	0
	Pneumonia	1	3	0	4
	Prolapso uterino	5	0	1	0
	Hematoma	0	1	0	0
	Pericardite	1	0	0	0
	Prolapso retal	0	1	1	0
	Animal em decúbito	4	0	0	0
	Eutanásia	1	0	0	2
	Atrésia anal	0	0	0	1
	Prolapso vaginal	0	0	2	0

	Timpanismo	0	1	1	0
	Onfaloflebite	0	4	0	6
	Estado de choque	0	2	0	1
	Acompanhamento	5	0	0	0
	Fratura/Luxação	1	1	1	0
	Hipocalcémia	2	0	0	0
	Paraplésia	0	0	0	1
	Ostertagiose Tipo II	1	0	0	0
	Queratoconjuntivite	0	1	0	0
	Mamite	3	0	1	0
	Laringite	0	0	0	1
	Tétano	0	0	0	1
Reprodução	Distócia	6	0	20	0
	Cesariana	0	0	1	0
	Metrite	1	0	0	0
	Diagnósticos de gestação	10	0	0	0
Cirurgia	Hérnia umbilical	0	2	0	0
	Deslocamento do abomaso à esquerda	1	0	0	0
	Flushing articular	0	1	0	0
Técnicas de diagnóstico	Necrópsia	0	2	3	7
	Cropologia	75			

Tabela 3 – Casuística relativa ao estágio realizado na clínica CapVéto em Bellac.

