

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

25-HIDROXIVITAMINA-D₃ MELHORA O METABOLISMO ENERGÉTICO E O
DESEMPENHO DE VACAS LEITEIRAS

ABIAS SANTOS SILVA

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como
parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Zootecnia

BOTUCATU-SP

Março-2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

25-HIDROXIVITAMINA-D₃ MELHORA O METABOLISMO ENERGÉTICO E O
DESEMPENHO DE VACAS LEITEIRAS

ABIAS SANTOS SILVA

Orientador: Prof. Dr. Mário De Beni Arrigoni

Coorientador: Dr. Mirton José Frota Morenz

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como
parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Zootecnia

BOTUCATU-SP

Março-2021

S5862

Silva, Abias Santos

25-hidroxivitamina-D3 melhora o metabolismo energético e o desempenho de vacas leiteiras / Abias Santos Silva. -- Botucatu, 2021
97 p. : tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientador: Mário De Beni Arrigoni

Coorientador: Mirton José Frota Morenz

1. Dieta de transição. 2. Hipocalcemia. 3. Metabolismo energético.
4. Metabolismo mineral. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Abias Santos Silva – nascido em 28 de novembro de 1987, na cidade de Manoel Vitorino–BA, filho de Zenildo Ferreira da Silva e Maria Lúcia Santos, ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Itapetinga, em agosto de 2011 e gradou-se em maio de 2016. Em março de 2016 iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Itapetinga, onde foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e finalizou o curso de Mestrado em fevereiro de 2018. Em março de 2018 iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

A Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais Zenildo e Lúcia e aos meus irmãos Abner, Dijay e Patrícia pelos conselhos, ensinamentos, apoio e amor incondicional ao longo da vida e na trajetória acadêmica

Ao meu amigo e mentor Francisco José Cavalcante Pereira por todos os ensinamentos e conselhos.

DEDICO!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela perfeita saúde, disposição para trabalhar e fé, pois é a fé que nos leva em alguma direção, seja ela qual for.

A meus pais Lúcia e Zenildo e aos meus irmãos Abner, Patrícia e Dijay por sempre estarem ao meu lado, pelos conselhos, ensinamentos e amor incondicional e por serem os exemplos pra minha vida, pois família é o bem mais precioso e que está do nosso lado em todos os momentos.

À Jaciara Diavão pelo companheirismo, carinho, amor e cuidado.

Agradeço a meu amigo Francisco José Cavalcante Pereira pelos ensinamentos, amizade e confiança ao longo desses anos, a quem tenho enorme admiração e respeito.

Ao meu orientador Mário De Beni Arrigoni pela amizade, confiança em mim creditada.

Ao meu Coorientador, Mirton José Frota Morenz pela amizade e ensinamentos transmitidos, pela oportunidade de mais uma vez trabalhar na Embrapa para desenvolvimento do projeto de Doutorado.

Aos professores da pós-graduação André Mendes Jorge, José Roberto Sartori, Danilo Domingues Millen, Antônio Celso Pezzato, José Eduardo Portela Santos, José Luiz Moraes Vasconcelos, Luiz Edivaldo Pezzato, Margarida Maria Barros e Pedro de Magalhães Padilha pelos ensinamentos transmitidos e apoio.

Aos pesquisadores da Embrapa Luiz Gustavo Ribeiro Pereira e Thierry Ribeiro Tomich pelas boas conversas e ensinamentos.

Aos pesquisadores da Embrapa Mariana Magalhães Campos, Carlos Augusto Gomide, Domingos Paciullo pelo incentivo e ensinamentos.

Ao professor Otávio Rodrigues Machado Neto pela supervisão durante o estágio em docência e as ótimas sugestões para melhoria da tese e ao Dr. Welder Angelo Baldassini pela amizade e sugestões pontuais para correção da tese.

Ao Técnico Ernando Ferreira Motta pelo empenho na realização das análises laboratoriais.

Aos amigos de pós-graduação da UNESP, Bismarck Moreira, Leone Campos, Mateus Ferreira, Tânia Viera, Beatriz Ribas, Ana Paula Oliveira, Isabella Marconato, João Paulo, Anderson Kloster, Felipe, Osvaldo e Thiago pelo companheirismo.

Aos estagiários da Embrapa, Carol Weber, Mariana Hallak, Thais Jaguaribe, Rômany Louise, Jhenifer Sangi, Samuel Pardim, Ronieri Nichellatti, Bruno Marucci, Mariana Andrade, Camila, Romolo Pinheiro, Taís Sousa, Bianca Albuquerque pela ajuda durante condução dos experimentos.

Aos pós-graduandos da Embrapa, Layanne Ferreira, João Sacramento, Rebeca Silvi, Vanessa Teixeira, Gleici, Daiana Lopes, Natalia Ávila, Conrado Trigo, Rafael Menezes e Frederico Pires, Sabrina Vieira por toda ajuda durante a coleta de dados e amizade.

À Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho-Campus de Botucatu (UNESP) pela oportunidade de realização do curso Doutorado.

À Embrapa Gado de Leite pelo suporte com pessoal, estruturas e análises laboratoriais para desenvolvimento do projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À DSM Produtos Nutricionais S.A. pelo suporte financeiro dado ao projeto, fornecimento das dietas experimentais e análises laboratoriais.

MUITO OBRIGADO!!

“A vitamina D é fundamental para o funcionamento de diversos sistemas fisiológicos, em síntese a vitamina D é indispensável para a vida.” (DELUCA, 2004).

RESUMO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da suplementação na dieta acidogênica de calcidiol nos minerais e metabólitos no sangue, balanço mineral, incidência de doenças no pós-parto, perfil hematológico, comportamento ingestivo, balanço de energia, e produção de leite em vacas leiteiras da raça Holandês. Foram utilizadas 40 vacas multíparas com peso corporal de (PC), escore de condição corporal (ECC), número de lactações e produção média na lactação anterior, respectivamente, (média \pm desvio padrão) de $661,2 \pm 59,18$ kg; $3,46 \pm 0,35$; $1,7 \pm 0,86$; e $33,1 \pm 6,42$ kg/dia, alocadas dentro de blocos (20 vacas em cada tratamento) 30 dias antes da data prevista do parto, recebendo uma dieta basal acidogênica (373 g/kg de FDN e 136 g/kg de PB com base na matéria seca; -110 mEq/kg), os tratamentos foram: i) suplementação com colecalciferol (CTRL) (3,0 mg/dia) e ii) suplementação com calcidiol (CA) na concentração de 3,0 mg/dia. Após o parto, todas as vacas receberam a mesma dieta de lactação. Amostras de sangue foram coletadas nos dias -7 , 0 , 1 , 2 , 7 , 21 e 42 relativos ao parto para análise de cálcio, fósforo, magnésio, 25-hidroxivitamina-D₃, paratormônio, glicose, insulina, ácidos graxos não esterificados e β -hidroxibutirato. Não houve efeito de tratamento para o cálcio ionizado no pré-parto (-7 d). Tendência de aumento na concentração de cálcio (Ca) ionizado (iCa) foi observada no pós-parto nas vacas suplementadas com calcidiol ($+0,07$ mM). O calcidiol aumentou a concentração de 25-OH-D₃ no plasma (CTRL = $66,6$ vs. CA = $245,3$ ng/mL). As vacas suplementadas com calcidiol excretaram mais Ca na urina ($+4,82$ g/dia). As vacas suplementadas com calcidiol apresentaram tendência de aumento na ingestão de matéria seca no pré-parto ($+1,0$ kg/dia). A suplementação com calcidiol aumentou a concentração de glicose no plasma e reduziu a concentração de ácidos graxos não esterificados no plasma. A suplementação com calcidiol aumentou as produções de colostro, de leite (CTRL = $29,7$ vs. CA = $32,5$ kg/dia), leite corrigido para gordura (CTRL = $29,9$ vs. CA = $33,1$ kg/dia) e leite corrigido para energia (CTRL = $29,3$ vs. CA = $32,4$ kg/dia). Houve tendência de aumento na ingestão calórica para o grupo calcidiol. A fonte de vitamina D não afetou o balanço energético líquido e o peso corporal no pré-parto. Houve tendência para aumento da energia líquida secretada no leite para as vacas tratadas com calcidiol (CTRL = $19,9$ vs. CA = $21,7$ Mcal/dia). A suplementação de vacas leiteiras nos últimos 21 dias pré-parto com calcidiol melhorou o metabolismo ósseo e aumentou a excreção de Ca na urina; aumentou a produção de colostro e a concentração de glicose no dia do parto; melhorou o metabolismo energético e aumentou a produção de leite, leite corrigido para gordura e energia, e a produção dos constituintes do leite.

Palavras-chave: Dieta de transição. Hipocalcemia. Metabolismo energético. Metabolismo mineral

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effects of supplementation in the acidogenic diet of calcidiol on minerals and metabolites in the blood, mineral balance, incidence of postpartum diseases, hematological profile, ingestive behavior, energy balance, and milk yield in Holstein dairy cows. Forty multiparous Holstein cows with mean body weight (BW), body condition score (BCS), parity and milk production in the previous lactation, respectively (mean \pm standard deviation) of 661.2 ± 59.18 kg; 3.46 ± 0.35 ; 1.7 ± 0.86 ; and 33.1 ± 6.42 kg/d, were allocated within the blocks (20 cows per treatment), 30 days before the expected calving date receiving an acidogenic diet (373 g/kg of NDF and 136 g/kg of CP; DM basis; -110 mEq/kg). Dietary treatments were: i) cholecalciferol (CTRL) at 3.0 mg/d; ii) calcidiol (CA) at 3.0 mg/d. The experimental diets were provided 30 days before the expected calving date until the day of calving. After calving, all cows fed the same lactation diet. Blood samples were collected on -7 , 0, 1, 2, 7, 21 and 42 days related to calving for analysis of calcium, phosphorus, magnesium, parathyroid hormone, 25-hydroxyvitamin-D₃, glucose, insulin, non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyrate. There was no treatment effect for ionized calcium (iCa) in the prepartum period (-7 d). A trend of increase in iCa was observed in the postpartum for the cows supplemented with calcidiol ($+0.07$ mM). Calcidiol increased the concentration of 25-hydroxyvitamin-D₃ (CTRL = 66.6 vs. CA = 245.3 ng/mL). Cows supplemented with calcidiol excreted more Ca in the urine ($+4.82$ g/d). Calcidiol tended increase the prepartum DMI ($+1.0$ kg/d). Calcidiol increased colostrum yield, glucose and reduced non-esterified fatty acids concentration. Calcidiol increased milk yield (CTRL = 29.7 vs. CA = 32.5 kg/d), fat-corrected milk (CTRL = 29.9 vs. CA = 33.1 kg/d) and energy-corrected milk (CTRL = 29.3 vs. CA = 32.4 kg/d). The cows fed calcidiol tended increase the caloric intake. The source of vitamin D did not affect the net energy balance and body weight. Calcidiol tended increase energy secreted as milk (CTRL = 19.9 vs. CA = 21.7 Mcal/d). Supplementation of dairy cows in the last 21 days prior to calving with calcidiol improved bone metabolism and increased the urine Ca excretion; increased colostrum yield and glucose concentration on calving day; improved energy metabolism and increased milk production, fat and energy corrected milk, and production of milk constituents.

Keywords: Energy metabolism. Hypocalcemia. Mineral metabolism. Transition diet

LISTA DE ILUSTRAÇÕES**CAPÍTULO II**

- Figura 1.** Concentração de calcidiol (25-hidroxivitamina-D₃) no plasma de vacas da raça Holandês recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol..... 52
- Figura 2.** Ruminação (A) e atividade (B) de vacas leiteiras suplementadas com colecalciferol ou calcidiol.....61
- Figura 3.** Concentração de glicose (A), insulina (B), ácidos graxos não esterificados - AGNE (C) e β -hidroxibutirato - BHB (D) de vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol. 66
- Figura 4.** Produção de leite (A) e de leite corrigido para gordura - 3,5%LCG (B) e energia - LCE (C) de vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol..... 69

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Proporção e composição química das dietas experimentais	40
Tabela 2. Concentrações séricas de cálcio ionizado, cálcio total, fósforo e magnésio totais e nas concentrações de 25-hidroxivitamina-D ₃ (25-OH-D ₃) e paratormônio (PTH) no plasma de vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol	51
Tabela 3. Volume urinário e concentrações de creatinina, Ca e Mg na urina em vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol.....	54
Tabela 4. Balanço mineral estimado no pré e pós-parto em vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol.....	55
Tabela 5. Perfil hematológico no pós-parto de vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol	57
Tabela 6. Incidência de doenças clínicas em vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol	58
Tabela 7. Tempo de ruminação e atividade em vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol	59
Tabela 8. Consumo de matéria seca (CMS), balanço de energia, peso corporal (PC) e escore de condição corporal (ECC) no pré-parto de vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol	62
Tabela 9. Produção de colostro e secreção de Ca e Mg no colostro de vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol.....	63

- Tabela 10.** Concentração plasmática de glicose, insulina, ácidos graxos não esterificados (AGNE) e β -hidroxibutirato (BHB) no plasma de vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol..... 65
- Tabela 11.** Produção de leite (PL), produção de leite corrigida para gordura (3,5%LCG) e energia (LCE) e composição do leite de vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol 67
- Tabela 12.** Consumo de matéria seca (CMS), ingestão calórica, balanço de energia líquido (BEL), peso corporal (PC), variação do peso corporal e escore de condição corporal (ECC) no pós-parto de vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol 71
- Tabela 13.** Coeficientes de correlação de Pearson para as concentrações de iCa, tCa, tMg, Mg e Ca secretado no colostro, Ca (uCa) e Mg (uMg) na urina, 25-OH-D₃, balanço de Ca e Mg, glicose, BHB e produção de leite..... 72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AGNE	Ácidos graxos não esterificados
BEN	Balanço energético negativo
CA	Calcidiol
Ca	Cálcio
Cl	Cloro
CMS	Consumo de matéria seca
EE	Extrato etéreo
CNF	Carboidratos não fibrosos
CHCM	Concentração corpuscular média de hemoglobina
C ₂₅	Posição do carbono na cadeia
DCAD	Diferença cátion-aniônica da dieta
ECC	Escore de condição corporal
CTRL	Controle
ELI	Energia líquida para lactação
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (sigla em inglês)
iCa	Cálcio ionizado
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
K	Potássio

LCE	Leite corrigido para gordura
LCG	Leite corrigido para energia
mmol	Milimol
mM	Milimol
Mg	Magnésio
MS	Matéria seca
Na	Sódio
ng	Nanograma
NRC	National Research Council
NT	Nitrogênio total
MO	Matéria orgânica
P	Fósforo
PB	Proteína bruta
PC	Peso corporal
pg	Picograma
PTH	Paratormônio
S	Enxofre
tCa	Cálcio total
tMg	Magnésio total
tP	Fósforo total
TRPV5	Receptor potencial transitório vaniloide tipo 5
TRPV6	Receptor potencial transitório vaniloide tipo 6

VCM	Volume corpuscular médio
VDR	Receptor de vitamina D
25-OH-D ₃	25-hidroxivitamina-D ₃ ou Calcidiol

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	17
Considerações iniciais	18
1. Revisão de Literatura	19
1.1 Período de transição	19
1.2 Doenças metabólicas no pós-parto.....	20
1.2.1 Hipocalcemia subclínica.....	21
1.2.2 Relação entre hipocalcemia e outras doenças no pós-parto	22
1.3 Dietas acidogênicas.....	23
1.4 Metabolismo do Cálcio	24
1.5 Metabolismo da vitamina D	26
Referências	28
CAPÍTULO II -“25-hidroxivitamina-D ₃ associada à dieta acidogênica melhora o metabolismo energético e o desempenho de vacas leiteiras”	33
RESUMO	35
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAL E MÉTODOS.....	38
RESULTADOS	50
DISCUSSÃO.....	73
CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS	86
IMPLICAÇÕES	97

CAPÍTULO I

Considerações iniciais

A intensificação dos sistemas de produção de leite ocorre rapidamente, demandando tecnologias que permitam otimizar a produtividade dos animais. Nesse contexto, a exigência energética desses animais também aumenta significativamente, o que torna o início da lactação um grande desafio para a vaca, assim o período de transição demanda atenção para garantir a saúde e o bom desempenho dos animais ao longo da lactação.

O período de transição compreende o intervalo de três a quatro semanas antes do parto e três a quatro semanas após o parto, sendo caracterizado por diversas alterações fisiológicas e metabólicas. As alterações ocorrem porque a exigência nutricional do animal aumenta demasiada e bruscamente nessa fase. No terço final da gestação, o crescimento fetal ocorre de forma exponencial, com isso o rúmen é comprimido e a capacidade de ingestão de matéria seca fica comprometida. Além disso, todas as mudanças fisiológicas que ocorrem nesse período favorecem a depressão no consumo de matéria seca e, em contrapartida, a exigência em energia aumenta em função da produção de colostro e leite.

Durante este período, o metabolismo mineral, o metabolismo de energia, e o sistema imune ficam comprometidos, considerando que no final da gestação, uma vaca necessita em torno de 21 g de cálcio (Ca)/dia para manutenção. Contudo, quando começa a produção de colostro, essa demanda passa a ser de 23 g/dia somente para secreção no colostro e em decorrência da menor ingestão de matéria seca, a vaca passa a depender da absorção intestinal e da reabsorção óssea e renal de Ca. Da mesma forma, a redução na ingestão de matéria seca provoca incremento na mobilização de reservas corporais, aumentando os riscos de cetose e acúmulo de ácidos graxos não esterificados no tecido hepático. Portanto, nesse período podem ocorrer diversos distúrbios como distocia, hipocalcemia, cetose, metrite, esteatose hepática e mastite, que podem interferir no desempenho futuro da vaca, gerando grandes perdas de produção de leite e diminuição dos índices reprodutivos, com consequente prejuízo econômico do sistema produtivo.

Diante de todos os problemas que podem ocorrer durante o período de transição, várias estratégias podem ser adotadas com o objetivo de prevenir a ocorrência de todos estes distúrbios, dentre as quais, a utilização de dietas acidogênicas no período pré-parto, bem como, a suplementação com formas ativas da vitamina D para auxiliar no metabolismo do Ca. No entanto, a utilização dessas estratégias deve levar em consideração os fatores locais como os alimentos que irão compor a dieta de transição e fatores relacionados à incidência de luz solar, já que a vitamina D pode ser sintetizada através de reações químicas do ergosterol

presente na pele e a radiação ultravioleta. Dessa forma, o tipo de sistema de produção utilizado, a pasto ou confinado podem promover o sucesso ou fracasso da adoção de tais tecnologias. O Brasil sendo um país tropical, apresenta alta incidência de luz solar e teoricamente a utilização de vitamina D em animais criados nestas condições pode ser menos necessária quando comparada com a utilização em países tipicamente de clima temperado. Ainda nesse contexto, os ingredientes tipicamente utilizados em sistemas de criação de clima temperado apresentam menor concentração de potássio (K), o que favorece a redução da utilização de sais acidogênicos nas dietas sem comprometer a redução do pH sanguíneo necessário para efetiva homeostase do Ca no período de transição.

1. Revisão de Literatura

1.1 Período de transição

O período de transição é o período mais crítico da vaca leiteira em função de todas as mudanças metabólicas e fisiológicas que ocorrem nessa fase. Esse período é caracterizado por três a quatro semanas que antecedem o parto até três a quatro semanas após o mesmo. Essa fase é caracterizada por drásticas alterações endócrinas associadas à passagem da fase não lactante para a fase lactante. Quando a vaca passa por essa fase com manejo e nutrição inadequados, queda na produção de leite, menores índices reprodutivos e, conseqüentemente, incremento em perdas de ordem econômica são inevitáveis (DRACKLEY, 1999).

A maior parte das doenças metabólicas ocorre nos primeiros 10 dias pós-parto (INGVARTSEN; DEWHURST; FRIGGENS, 2003). Uma das causas desses acontecimentos se dá pela diminuição da capacidade da resposta imune em razão do aumento de metabólitos que interferem na função e atividade leucocitária (CONTRERAS; SORDILLO, 2011; LEBLANC, 2020), aliada às menores concentrações de glicose e disponibilidade de cálcio no sangue (LEBLANC, 2020). Concentrações de glicose de 2,2 a 3,3 mM e Ca ionizado de 1,05 a 1,25 mM são considerados normais em vacas leiteiras (GOFF, 2008; MAIR et al., 2016). Todas essas mudanças fazem do período de transição o maior desafio para a vaca leiteira de alta produção.

Para suportar todas essas mudanças fisiológicas, a vaca tem de se adaptar às condições impostas no período de transição (SUNDRUM, 2015). Esse mecanismo de adaptação é chamado de homeorrese (MARTENS, 2020). A homeorrese é descrita como as adaptações

fisiológicas e metabólicas em resposta a mudanças no estado fisiológico normal do animal (BAUMAN; CURRIE, 1980), enquanto que, a homeostase é um processo normal de controle que envolve a manutenção do equilíbrio fisiológico de qualquer ser vivo.

Quando o animal está em homeorrese, o animal experimenta mudanças de ordem fisiológica e metabólica, com aumento dos níveis de ácidos graxos não esterificados (AGNE) (LEBLANC, 2010) e de corpos cetônicos (CARDOSO; KALSCHEUR; DRACKLEY, 2020), além de desordens no metabolismo mineral (MARTINEZ et al., 2012), principalmente relacionadas aos níveis de cálcio no sangue. Devido às modificações fisiológicas desse período, é comum a ocorrência de depressão do consumo de matéria seca (CMS) no pré-parto (BLOCK, 2010) e pós-parto (CHEONG et al., 2016; WANKHADE et al., 2017).

A diminuição do CMS exacerba a necessidade da vaca leiteira em mobilizar reservas corporais para produção de colostro e leite e isso implica em aumento da circulação de corpos cetônicos e de AGNE. Além disso, a condição corporal do animal no pré-parto exerce função importante nesse período (GÄRTNER et al., 2019), modulando a capacidade de resposta fisiológica frente às concentrações dos metabólitos sanguíneos, caracterizada por maior resistência à insulina (KARIS et al., 2020). Apesar do aumento da concentração de glicose sanguínea no pós-parto (GÄRTNER et al., 2019), essa glicose pode não ser transportada para o interior da célula (JAAKSON et al., 2018) e o animal lança mão de outros mecanismos para obter energia, por meio do catabolismo de ácidos graxos.

1.2 Doenças metabólicas no pós-parto

Doenças no pós-parto imediato são comuns em vacas leiteiras de alta produção. As alterações metabólicas e fisiológicas que ocorrem nesse estágio levam à depressão do sistema imunológico e predisõem o animal ao ataque de patógenos e aparecimento de doenças, como distocia, retenção de placenta, metrite e mastite, comumente reportadas nos primeiros dias do pós-parto. Nesse cenário, aproximadamente 30 a 50% das vacas são acometidas por alguma doença no pós-parto imediato (LEBLANC, 2013).

A incidência de doenças no pós-parto aumenta os prejuízos econômicos devido ao aumento na mortalidade ou morbidade, ao passo que a permanência dos animais no rebanho que apresentam doenças no pós-parto imediato é reduzida (PROBO et al., 2018). Nesse sentido, tem sido relatado que a incidência de hipocalcemia subclínica ou clínica, retenção de placenta, metrite, cetose subclínica, deslocamento de abomaso e mastite foram de 43,6; 4,0;

10,4; 9,6; 21,8; 2,7 e 6,1%, respectivamente (REINHARDT et al., 2011; SUTHAR et al., 2013).

De maneira geral, a incidência de doenças no pós-parto imediato está sujeita às adaptações e alterações fisiológicas que a vaca sofre no período de transição. Essas mudanças, acompanhadas da queda na ingestão de alimentos, alteram o estado metabólico da vaca e compõem um ponto chave de resposta do animal. Essa resposta negativa ocorre devido ao aumento da exigência em energia da vaca para todos os processos metabólicos, ao passo que o balanço energético negativo (BEN) é exacerbado, pois mais energia é requerida (Mcal/dia), sem que seu suprimento seja atendido. Assim, todos os sistemas metabólicos e digestivo trabalham de forma intercalada e a falha deles pode predispor o animal às doenças (MCGUFFEY, 2017).

1.2.1 Hipocalcemia subclínica

A hipocalcemia subclínica é um distúrbio metabólico comum que acomete vacas leiteiras no período de transição. Pelo menos 50% das vacas sofrem de hipocalcemia subclínica, variando entre 25 e 54%, dependendo do número de lactações (REINHARDT et al., 2011). A concentração menor que 1,0 mM de Ca ionizado (iCa) é utilizada como sendo o limiar para diagnóstico de hipocalcemia (CHAMBERLIN et al., 2013; MARTINEZ et al., 2014). Outros autores consideram as concentrações de Ca total menor que 2,0 mM (REINHARDT et al., 2011) ou menor que 2,15 mM (MARTINEZ et al., 2012) para diagnóstico da hipocalcemia subclínica.

Os principais fatores que influenciam a ocorrência da patologia envolvem a manipulação da diferença cátion-aniônica da dieta (MARTINEZ et al., 2018); a concentração de Ca, Mg e P na dieta, a raça da vaca (DEGARIS; LEAN, 2008) e o número de lactações (REINHARDT et al., 2011). Esses fatores estão relacionados com a concentração, absorção intestinal e reabsorção óssea e renal, com participação direta do hormônio da paratireoide (PTH) e o metabólito ativo da vitamina D (1,25-dihidroxitamina-D₃) (HORST; GOFF; REINHARDT, 1994).

Vacas com hipocalcemia apresentam menor produção de leite e CMS, e podem desenvolver outras doenças associadas, como a metrite (MCGUFFEY, 2017), além de terem o sistema imune deprimido (MARTINEZ et al., 2014). A ordem de lactação é um fator importante no desenvolvimento da hipocalcemia. Com o avanço do número de lactações,

ocorre redução da concentração de Ca no sangue devido à diminuição da sensibilidade dos receptores de transporte e absorção do Ca em resposta ao aumento da idade da vaca (HORST; GOFF; REINHARDT, 1994; REINHARDT et al., 2011). Vacas primíparas apresentam nove vezes mais receptores de vitamina D no intestino que vacas múltíparas (HORST; GOFF; REINHARDT, 1994).

Portanto, aparentemente, não são as concentrações *per se* de paratormônio (PTH) e vitamina D envolvidas na homeostase do Ca que determinam a concentração de Ca no sangue, já que vacas hipocalcêmicas apresentam maiores concentrações de PTH e vitamina D que animais normocalcêmicos (MAYER et al., 1969), mas sim a responsividade do Ca a esses hormônios calcicotróficos (GOFF; LIESEGANG; HORST, 2014).

Neste contexto, parece haver uma regulação integrada entre o metabolismo energético e ósseo, pois vacas hipocalcêmicas apresentam menor concentração de insulina no plasma, maior concentração de AGNE e menor capacidade fagocítica e queima oxidativa dos neutrófilos (MARTINEZ et al., 2014).

1.2.2 Relação entre hipocalcemia e outras doenças no pós-parto

Vacas hipocalcêmicas apresentam maior chance de desenvolvimento de doenças e possibilidade de descarte nos primeiros 210 dias de lactação (MARTINEZ et al., 2016). O Ca apresenta diversas funções fisiológicas e o organismo possui um mecanismo homeostático que permite a manutenção rigorosa dos níveis sanguíneos de Ca. Portanto, a redução da concentração de Ca circulante pode promover diversas mudanças fisiológicas que acarretam na supressão do sistema imune do animal e aumenta a chance de desenvolvimento de determinadas doenças.

O Ca participa ativamente da sinalização celular para que ocorra a contratilidade muscular. A deficiência de Ca reduz a contração do músculo liso e esquelético que são dependentes de Ca (MURRAY et al., 2008). Portanto, a redução sérica de Ca aumenta o risco da ocorrência de retenção de placenta, metrite e deslocamento de abomaso (RODRIGUEZ et al., 2017).

A função imune também é afetada pela concentração de Ca no sangue. Martinez et al. (2012) observaram que vacas com concentração de Ca menor que 2,14 mM nos primeiros três dias pós-parto apresentaram menor concentração de neutrófilos no sangue, menor capacidade fagocítica e menor capacidade de queima oxidativa em resposta a algum patógeno. Além

disso, vacas hipocalcêmicas apresentam maior concentração de AGNE no plasma. Vacas que apresentam elevada concentração de AGNE no plasma tem redução do interferon- γ (IFN- γ) (LECETERA et al., 2004), uma citocina primordial para ativação dos macrófagos. Além disso, a viabilidade e a função de células polimorfonucleares foram suprimidas com o aumento dos AGNE (LECETERA et al., 2004).

A incidência de metrite está diretamente relacionada com a hipocalcemia (MARTINEZ et al., 2016). Nesse contexto, a metrite reduz a taxa de concepção e aumenta o intervalo do parto à concepção (GIULIODORI et al., 2013), apresentando menor desempenho reprodutivo (RIBEIRO et al., 2016).

Desse modo, diversos sistemas estão integrados na adaptação da vaca leiteira no período de transição que podem determinar a resposta da vaca nesse período crítico de alta demanda por Ca e energia. Dessa forma, a hipocalcemia subclínica desencadeia diversas adaptações fisiológicas e metabólicas que podem aumentar a incidência de doenças no pós-parto imediato.

1.3 Dietas acidogênicas

Os estudos sobre a utilização de dietas com potencial de provocar acidose metabólica moderada para prevenção da hipocalcemia tiveram início nos anos de 1980 (BLOCK, 1984). Diversas teorias foram provadas, enquanto outras ainda necessitam de maior esclarecimento, como: quais são os fatores envolvidos na redução do CMS em vacas que consomem dietas acidogênicas (SANTOS et al., 2019) e qual o tempo ideal que as vacas devem permanecer recebendo a dieta acidogênica (DEGARIS; LEAN, 2008; LOPERA et al., 2018).

Diversos modelos foram propostos para calcular a diferença cátion-aniônica das dietas (DCAD). Horst et al. (1997) propuseram uma equação que considera a eficiência de absorção dos cátions e ânions, onde $DCAD = (0,38*Ca^{+2} + 0,3 Mg^{+2} + Na^{+1} + K^{+1}) - (Cl^{-1} + S^{-2})$. Já Goff (1999) propôs que existe variação na capacidade dos sais em acidificar a urina, dessa forma foi proposta a seguinte equação: $DCAD = (0,15*Ca^{+2} + 0,15*Mg^{+2} + Na^{+1} + K^{+1}) - (Cl^{-1} + 0,25*S^{-2} + 0,5* P^{-3})$. Contudo, a equação mais comumente utilizada é a proposta por Block (1984): $DCAD = (Na^{+1} + K^{+1}) - (Cl^{-1} + S^{-2})$.

O objetivo de modificar o balanço cáti-aniônico da dieta é provocar uma leve acidose metabólica no sangue e melhorar a capacidade da vaca em repor o Ca sanguíneo (LEAN et al., 2006). Ou seja, ocorre um mecanismo compensatório de reabsorção óssea de Ca para

promover a homeostase no sangue (BLOCK, 1984). Com isso, a redução do DCAD aumenta a absorção intestinal de Ca e a sensibilidade dos tecidos alvos a hormônios calcicotróficos, como o PTH (LEAN et al., 2014).

Diversos estudos têm comprovado a eficácia da utilização de dietas acidogênicas no pré-parto de vacas leiteiras (LEAN et al., 2019; LOPERA et al., 2018; ZIMPEL et al., 2018). Em uma meta-análise sobre o uso de dietas acidogênicas, Santos et al. (2019) observaram que ocorreu redução (-0,6 kg/dia) do CMS em vacas primíparas e multíparas no pré-parto e tendência de aumento no CMS pós-parto (+0,9 kg/dia). Contudo, a dieta acidogênica apresentou efeito positivo na produção de leite apenas nas vacas multíparas (+1,7 kg/dia), em função da diminuição dos receptores intracelulares da vitamina D associada com o avanço da idade (HORST; GOFF; REINHARDT, 1994). Lean et al. (2019) observaram aumento de 0,13 mM de Ca sérico no dia do parto em vacas primíparas e multíparas com o uso de dieta acidogênica. No estudo de Santos et al. (2019), a diminuição do DCAD da dieta reduziu também a incidência de doenças no pós-parto.

O efeito do tempo de exposição às dietas acidogênicas também tem sido objeto de estudo (DEGARIS; LEAN, 2008; LOPERA et al., 2018; VIEIRA-NETO et al., 2021). Degaris et al. (2008) observaram aumento da produção de leite corrigido para gordura e proteína até 25 dias de utilização da dieta acidogênica no pré-parto. Entretanto, à medida que as vacas consumiram a dieta acidogênica por maior tempo, houve redução na concentração da gordura no leite (DEGARIS; LEAN, 2008). Lopera et al. (2018) testaram a ampliação da utilização da dieta acidogênica de 21 para 42 dias e observaram que as vacas que receberam a dieta acidogênica durante 42 dias produziram menos 2,3 kg/leite/dia que as vacas recebendo dieta com DCAD negativo durante 21 dias (38,1 vs. 40,4 kg/dia). A razão para isto não está completamente esclarecida, no entanto, possivelmente a utilização dessas dietas acidogênicas a longo prazo afeta a diferenciação celular do epitélio mamário em células secretórias e, conseqüentemente, a produção de leite (LOPERA et al., 2018).

1.4 Metabolismo do Cálcio

O Cálcio participa de vários processos fisiológicos como contração muscular, coagulação do sangue, permeabilidade da membrana, condução nervosa, atividade enzimática e liberação de hormônios (HERNÁNDEZ-CASTELLANO; HERNANDEZ; BRUCKMAIER, 2019).

Em condições fisiológicas normais a concentração sérica de Ca total varia entre 2,2 a 2,5 mM. Contudo, durante o período de transição, especialmente no pós-parto imediato, os níveis séricos de Ca reduzem drasticamente (CHAMBERLIN et al., 2013; VENJAKOB et al., 2018) devido à grande secreção de Ca no colostro e leite no pós-parto, em torno de 20 a 30 g/dia.

A manutenção dos níveis de Ca sanguíneos se dá por três vias regulatórias: a absorção intestinal, reabsorção óssea e reabsorção renal de Ca. O PTH, calcitriol e calcitonina são os hormônios reguladores primários dos níveis de Ca no sangue. Quando há redução dos níveis de Ca no sangue, ocorre elevação da concentração de PTH (HORST; GOFF; REINHARDT, 1994) que, por sua vez, estimula a produção de calcitriol. O PTH estimula a secreção de 1- α -hidroxilase, a enzima que catalisa a conversão de calcidiol em calcitriol (HORST; GOFF; REINHARDT, 1994), metabólito responsável pelo aumento da absorção intestinal de Ca.

O transporte de Ca através da célula acontece por canais específicos de Ca chamados de receptor transitório potencial vanilóide tipo 5 (TRPV5; sigla do termo em inglês) e o receptor transitório potencial vanilóide tipo 6 (TRPV6) presentes nas membranas do tipo borda em escova (HERNÁNDEZ-CASTELLANO; HERNANDEZ; BRUCKMAIER, 2019). Já o transporte intracelular é regulado pela proteína ligada ao Ca, chamada calbindina-D_{9K} (CaBP_{9K}). Então, o Ca é transportado para a corrente sanguínea através da Ca ATPase (LIEBEN; CARMELIET; MASUYAMA, 2011). Contudo, evidências em ratos têm mostrado que o transporte de Ca através do epitélio pode ocorrer mesmo na ausência de TRPV6 e calbindina-D_{9K} (SCHRODER et al., 2015).

O esqueleto contém 99% de todo o Ca do organismo, sendo uma importante fonte deste mineral em situações drásticas de redução de Ca no sangue. A reabsorção óssea de Ca é mediada pelo PTH e o metabólito ativo da vitamina D (1,25-dihidroxitamina-D₃) (HORST, 1986; HORST; GOFF; REINHARDT, 1994), através da modulação de osteoblastos e osteoclastos. Os osteoblastos são o único tipo de célula óssea responsiva aos receptores proteicos da 1,25-dihidroxitamina-D₃ (HORST; GOFF; REINHARDT, 1994). O PTH e a 1,25-dihidroxitamina-D₃ estimulam a sinalização para que ocorra reabsorção óssea, permitindo que a matriz óssea contribua com o *pool* de Ca no sangue (HORST; GOFF; REINHARDT, 1994).

A reabsorção de Ca nos rins é mediada pelo calcitriol, sendo o transporte de Ca feito transcelularmente no néfron distal (HOENDEROP; NILIUS; BINDELS, 2005). A entrada de

Ca nos rins ocorre por meio dos TRPV5 ligados à calbindina-D_{9k} e calbindina-D_{28k} (HOENDEROP; NILIUS; BINDELS, 2005).

1.5 Metabolismo da vitamina D

A vitamina D é um composto produzido a partir do 7-deidrocolesterol por meio da incidência de luz solar. A vitamina D₂ (ergosterol) está presente nas plantas, e nos mamíferos, a vitamina D₃ é a forma predominante (HORST; GOFF; REINHARDT, 1994).

O coledalciferol (vitamina D₃) é a principal forma de suplementação de vitamina D para vacas leiteiras (NRC, 2001). O NRC recomenda o consumo de 0,5 mg/dia de vitamina D para uma vaca da raça Holandês de 650 kg.

O coledalciferol é a forma da vitamina D inativa fisiologicamente, então a D-25-hidroxilase catalisa a reação no fígado de transformação da vitamina D₃ em 25-hidroxitamina-D₃ (calcidiol). No entanto, a vitamina D₃ precisa sofrer mais uma reação de hidroxilação nos rins para se tornar fisiologicamente ativa, reação catalisada pela 1- α hidroxilase, dando origem a 1,25-dihidroxitamina-D₃ (LIU et al., 2006). Concentrações plasmáticas de 20 a 50 ng/mL de 25-hidroxitamina-D₃ em vacas leiteiras são consideradas normais; menores que 5,0 ng/mL, indicam que o animal apresenta deficiência; e entre 200–300 ng/mL indicam toxidez por vitamina D (HORST; GOFF; REINHARDT, 1994). No entanto, animais que receberam suplementação na dieta com calcidiol não apresentaram indícios de toxidez com concentrações de 207 a 274 ng/mL (RODNEY et al., 2018a; RODNEY et al., 2018b; WEISS et al., 2015).

A vitamina D participa da ativação do sistema imune (NELSON et al., 2010; NELSON et al., 2012), absorção de Ca e P no intestino, mobilização de Ca ósseo, e reabsorção de Ca nos rins (DELUCA, 2004). Vacas múltiparas apresentam redução dos receptores de PTH e vitamina D (HORST; GOFF; REINHARDT, 1994). Por esse motivo, animais mais velhos apresentam maior susceptibilidade à hipocalcemia. Nesse contexto, a vitamina D ganha maior importância já que o principal hormônio envolvido na absorção intestinal é o 1,25-dihidroxitamina-D₃ (calcitriol), como mostram os estudos de Martinez et al. (2018) e Rodney et al. (2018b), nos quais a suplementação com 25-hidroxitamina-D₃ aumentou a concentração de Ca no sangue e a absorção intestinal em vacas leiteiras (MCGRATH; SAVAGE; GODWIN, 2013).

Para que a vitamina D ativa exerça a função de transporte do Ca, um receptor de vitamina D (VDR) deve estar presente no tecido alvo (SAED, 2020). Nesse contexto, existe uma correlação positiva entre a expressão gênica de VDR e a concentração de Ca no sangue (SAED, 2020). O complexo calcitriol com o VDR regula a expressão de cerca de 900 genes envolvidos nas mais diversas funções fisiológicas (KONGSBAK et al., 2013). A 1,25-dihidroxitamina-D₃ parece ser um importante regulador do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF₂₃) pelos osteoblastos na matriz óssea (LIU et al., 2006).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da suplementação na dieta acidogênica de calcidiol nos minerais e metabólitos no sangue, balanço mineral, incidência de doenças no pós-parto, perfil hematológico, comportamento ingestivo, balanço de energia, e produção de leite em vacas leiteiras da raça Holandês.

O Capítulo I aborda a literatura pertinente a respeito do tema em estudo e foi redigido de acordo com as normas para elaboração de dissertações e teses do Programa de Pós-graduação em Zootecnia – FMVZ/UNESP.

O Capítulo II intitulado “25-hidroxitamina-D₃ associada à dieta acidogênica melhora o metabolismo energético e o desempenho de vacas leiteiras” foi redigido de acordo com as normas do periódico *Journal of Dairy Science* – <https://www.journalofdairyscience.org/content/inst-auth>.

Referências

- BAUMAN, D.E.; CURRIE, B.W. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 9, p. 1514–1529, 1980.
- BLOCK, E. Manipulating Dietary Anions and Cations for Prepartum Dairy Cows to Reduce Incidence of Milk Fever. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 12, p. 2939–2948, 1984.
- BLOCK, E. Transition Cow Research – What Makes Sense Today? In: High Plains Dairy Conference, **Anais...**2010.
- CARDOSO, F.C.; KALSCHUR, K.F.; DRACKLEY, J.K. Symposium review: Nutrition strategies for improved health, production, and fertility during the transition period. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 6, p. 5684–5693, 2020.
- CHAMBERLIN, W.G.; MIDDLETON, J.R.; SPAIN, J.N.; JOHNSON, G.C.; ELLERSIECK, M.R.; PITHUA, P. Subclinical hypocalcemia, plasma biochemical parameters, lipid metabolism, postpartum disease, and fertility in postparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 11, p. 7001–7013, 2013.
- CHEONG, S.H.; SÁ FILHO, O.G.; ABSALÓN-MEDINA, V.A.; PELTON, S.H.; BUTLER, W.R.; GILBERT, R.O. Metabolic and endocrine differences between dairy cows that do or do not ovulate first postpartum dominant follicles. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 1, p. 1–11, 2016.
- CONTRERAS, G.A.; SORDILLO, L.M. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 3, p. 281–289, 2011.
- DEGARIS, P.J.; LEAN, I.J. Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 58–69, 2008.
- DELUCA, H.F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. **The American journal of clinical nutrition**, v. 80, n. 6 Suppl, p. 1689–1696, 2004.
- DRACKLEY, J.K. ADSA foundation scholar award: Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2259–2273, 1999.
- GÄRTNER, T.; GERNAND, E.; GOTTSCHALK, J.; DONAT, K. Relationships between body condition, body condition loss, and serum metabolites during the transition period in primiparous and multiparous cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 10, p. 9187–9199, 2019.
- GIULIODORI, M.J.; MAGNASCO, R.P.; BECU-VILLALOBOS, D.; LACAU-MENGIDO, I.M.; RISCO, C.A.; DE LA SOTA, R.L. Metritis in dairy cows: Risk factors and reproductive performance. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 6, p. 3621–3631, 2013.
- GOFF, J.P. Treatment of calcium, phosphorus, and magnesium balance disorders. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 15, n. 3, p. 619–639, 1999.
- GOFF, J.P. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 50–57, 2008.
- GOFF, J.P.; LIESEGANG, A.; HORST, R.L. Diet-induced pseudohypoparathyroidism: A hypocalcemia and milk fever risk factor. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1520–1528, 2014.

- HERNÁNDEZ-CASTELLANO, L.E.; HERNANDEZ, L.L.; BRUCKMAIER, R.M. Review: Endocrine pathways to regulate calcium homeostasis around parturition and the prevention of hypocalcemia in periparturient dairy cows. **Animal**, v. 14, n. 2, p. 330–338, 2019.
- HOENDEROP, J.G.J.; NILIUS, B.; BINDELS, R.J.M. Calcium absorption across epithelia. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 1, p. 373–422, 2005.
- HORST, R.L. Regulation of calcium and phosphorus homeostasis in the dairy Cow. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 2, p. 604–616, 1986.
- HORST, R.L.; GOFF, J.P.; REINHARDT, T.A.; BUXTON, D.R. Strategies for preventing milk fever in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1269–1280, 1997.
- HORST, R.L.; GOFF, J.P.; REINHARDT, T.A. Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 1936–1951, 1994.
- INGVARTSEN, K.L.; DEWHURST, R.J.; FRIGGENS, N.C. On the relationship between lactational performance and health: Is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. **Livestock Production Science**, v. 83, n. 2–3, p. 277–308, 2003.
- JAAKSON, H.; KARIS, P.; LING, K.; ILVES-LUHT, A.; SAMARÜTEL, J.; HENNO, M.; JÕUDU, I.; WALDMANN, A.; REIMANN, E.; PÄRN, P.; BRUCKMAIER, R.M.; GROSS, J.J.; KAART, T.; KASS, M.; OTS, M. Adipose tissue insulin receptor and glucose transporter 4 expression, and blood glucose and insulin responses during glucose tolerance tests in transition Holstein cows with different body condition. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 752–766, 2018.
- KARIS, P.; JAAKSON, H.; LING, K.; BRUCKMAIER, R.M.; GROSS, J.J.; PÄRN, P.; KAART, T.; OTS, M. Body condition and insulin resistance interactions with periparturient gene expression in adipose tissue and lipid metabolism in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 4, p. 3708–3718, 2020.
- KONGSBÄK, M.; LEVRING, T.B.; GEISLER, C.; VON ESSEN, M.R. The vitamin D receptor and T cell function. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 1–10, 2013.
- LEAN, I.J.; DEGARIS, P.J.; MCNEIL, D.M.; BLOCK, E. Hypocalcemia in dairy cows: Meta-analysis and dietary cation anion difference theory revisited. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 2, p. 669–684, 2006.
- LEAN, I.J.; DEGARIS, P.J.; CELI, P.; MCNEIL, D.M.; RODNEY, R.M.; FRASER, D.R. Influencing the future: Interactions of skeleton, energy, protein and calcium during late gestation and early lactation. **Animal Production Science**, v. 54, n. 9, p. 1177–1189, 2014.
- LEAN, I.J.; SANTOS, J.E.P.; BLOCK, E.; GOLDBERGER, H.M. Effects of prepartum dietary cation-anion difference intake on production and health of dairy cows: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 3, p. 2103–2133, 2019.
- LEBLANC, S. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. Suppl, p. 29–35, 2010.
- LEBLANC, S. Managing critical periods—transition dairy cows. (G. Dalin, Ed.) In: In Book of Abstracts, 15th Conference on Production Diseases in Farm Animals, Uppsala, Sweden. **Anais...** Uppsala, Sweden: Swedish University of Agricultural Science (SLU), 2013.
- LEBLANC, S.J. Review: Relationships between metabolism and neutrophil function in dairy cows in the peripartum period. **Animal**, v. 14, n. 1, p. 44–54, 2020.

LECETERA, N.; SCALIA, D.; FRANCI, O.; BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; NARDONE, A. Short Communication: Effects of nonesterified fatty acids on lymphocyte function in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 1012–1014, 2004.

LIEBEN, L.; CARMELIET, G.; MASUYAMA, R. Calcemic actions of vitamin D: Effects on the intestine, kidney and bone. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 4, p. 561–572, 2011.

LIU, S.; TANG, W.; ZHOU, J.; STUBBS, J.R.; LUO, Q.; PI, M.; QUARLES, L.D. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 5, p. 1305–1315, 2006.

LOPERA, C.; ZIMPEL, R.; VIEIRA-NETO, A.; LOPES, F.R.; ORTIZ, W.; POINDEXTER, M.; FARIA, B.N.; GAMBARINI, M.L.; BLOCK, E.; NELSON, C.D.; SANTOS, J.E.P. Effects of level of dietary cation-anion difference and duration of prepartum feeding on performance and metabolism of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 9, p. 7907–7929, 2018.

MAIR, B.; DRILLICH, M.; KLEIN-JÖBSTL, D.; KANZ.; BORCHARDT, S.; MEYER, L.; SCHWENDENWEIN, I.; IWERSEN, M. Glucose concentration in capillary blood of dairy cows obtained by a minimally invasive lancet technique and determined with three different hand-held devices. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 34, p. 1–11, 2016.

MARTENS, H. Transition period of the dairy cow revisited: I. Homeorhesis and its changes by selection and management. **Journal of Agricultural Science**, v. 12, n. 3, p. 1, 2020.

MARTINEZ, N.; RISCO, C.A.; LIMA, F.S.; BISINOTTO, R.S.; GRECO, L.F.; RIBEIRO, E.S.; MAUNSELL, F.; GALVÃO, K.; SANTOS, J.E.P. Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 12, p. 7158–7172, 2012.

MARTINEZ, N.; SINEDINO, L.D.P.; BISINOTTO, R.S.; RIBEIRO, E.S.; GOMES, G.C.; LIMA, F.S.; GRECO, L.F.; RISCO, C.A.; GALVÃO, K.N.; TAYLOR-RODRIGUEZ, D.; DRIVER, J.P.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 2, p. 874–887, 2014.

MARTINEZ, N.; SINEDINO, L.D.P.; BISINOTTO, R.S.; DAETZ, R.; LOPERA, C.; RISCO, C.A.; GALVÃO, K.N.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Effects of oral calcium supplementation on mineral and acid-base status, energy metabolites, and health of postpartum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 10, p. 8397–8416, 2016.

MARTINEZ, N.; RODNEY, R.M.; BLOCK, E.; HERNANDEZ, L.L.; NELSON, C.D.; LEAN, I.J.; SANTOS, J.E.P. Effects of prepartum dietary cation-anion difference and source of vitamin D in dairy cows: Lactation performance and energy metabolism. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 3, p. 2544–2562, 2018.

MAYER, G.; RAMBERG JR, C.F.; KRONFELD, D.S.; BUCKLE, R.M.; SHERWOOD, L.M.; AURBACH, G.D.; POTTS JR, J.T. Plasma parathyroid hormone concentration in hypocalcemic parturient cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 30, n. 9, p. 1587–1597, 1969.

MCGRATH, J.J.; SAVAGE, D.B.; GODWIN, I.R. The potential for pharmacological supply of 25-hydroxyvitamin D₃ to increase phosphorus utilisation in cattle. **Animal Production Science**, v. 53, n. 11, p. 1238–1245, 2013.

- MCGUFFEY, R.K.A. 100-Year Review: Metabolic modifiers in dairy cattle nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10113–10142, 2017.
- MURRAY, R.D.; HORSFIELD, J.E.; MCCORMICK, W.D.; WILLIAMS, H.J.; WARD, D. Historical and current perspectives on the treatment, control and pathogenesis of milk fever in dairy cattle. **Veterinary Record**, v. 163, n. 19, p. 561–565, 2008.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirements of dairy cattle. 7.rev.ed. Washinton, D.C.: 381p, 2001.
- NELSON, C.D.; REINHARDT, T.A.; THACKER, T.C.; BEITZ, D.C.; LIPPOLIS, J.D. Modulation of the bovine innate immune response by production of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in bovine monocytes. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 3, p. 1041–1049, 2010.
- NELSON, C.D.; REINHARDT, T.A.; LIPPOLIS, J.D.; SACCO, R.E.; NONNECKE, B.J. Vitamin D signaling in the bovine immune system: A model for understanding human vitamin D requirements. **Nutrients**, v. 4, n. 3, p. 181–196, 2012.
- PROBO, M.; PASCOTTINI, O.B.; LEBLANC, S.; OPSOMER, G.; HOSTENS, M. Association between metabolic diseases and the culling risk of high-yielding dairy cows in a transition management facility using survival and decision tree analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 10, p. 9419–9429, 2018.
- REINHARDT, T.A.; LIPPOLIS, J.D.; MCCLUSKEY, B.J.; GOFF, J.P.; HORST, R.L. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. **The Veterinary Journal**, v. 188, n. 1, p. 122–124, 2011.
- RIBEIRO, E.S.; GOMES, G.; GRECO, L.F.; CERRI, R.L.A.; VIEIRA-NETO, A.; MONTEIRO JR, P.L.J.; LIMA, F.S.; BISINOTTO, R.S.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Carryover effect of postpartum inflammatory diseases on developmental biology and fertility in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p. 2201–2220, 2016.
- RODNEY, R.M.; MARTINEZ, N.; BLOCK, E.; HERNANDEZ, L.L.; CELI, P.; NELSON, C.D.; SANTOS, J.E.P.; LEAN, I.J. Effects of prepartum dietary cation-anion difference and source of vitamin D in dairy cows: Vitamin D, mineral, and bone metabolism. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 3, p. 2519–2543, 2018a.
- RODNEY, R.M.; MARTINEZ, N.P.; CELI, P.; BLOCK, E.; THOMSON, P.C.; WIJFFELS, G.; FRASER, D.R.; SANTOS, J.E.P.; LEAN, I.J. Associations between bone and energy metabolism in cows fed diets differing in level of dietary cation-anion difference and supplemented with cholecalciferol or calcidiol. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 7, p. 1–21, 2018b.
- RODRÍGUEZ, E.M.; ARÍS, A.; BACH, A. Associations between subclinical hypocalcemia and postparturient diseases in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 9, p. 1–8, 2017.
- SAED, H.A.R.; IBRAHIM, H.M.M.; EL-KHODERY, S.A.; YOUSSEF, M.A. Relationship between expression pattern of vitamin D receptor, 1 alpha-hydroxylase enzyme, and chemokine RANTES genes and selected serum parameters during transition period in Holstein dairy cows. **Veterinary Record Open**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2020.
- SANTOS, J.E.P.; LEAN, I.J.; GOLDBERGER, H.; BLOCK, E. Meta-analysis of the effects of prepartum dietary cation-anion difference on performance and health of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 3, p. 2134–2154, 2019.

SCHRÖDER, B.; WILKENS, M.R.; RICKEN, G.E.; LEONHARD-MAREK, S.; FRASER, D.R.; BREVES, G. Calcium transport in bovine rumen epithelium as affected by luminal Ca concentrations and Ca sources. **Physiological Reports**, v. 3, n. 11, p. 1–7, 2015.

SUNDRUM, A. Metabolic disorders in the transition period indicate that the dairy cows' ability to adapt is overstressed. **Animals**, v. 5, n. 4, p. 978–1020, 2015.

SUTHAR, V.S.; CANELAS-RAPOSO, J.; DENIZ, A.; HEUWIESER, W. Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 2925–2938, 2013.

VENJAKOB, P.L.; PIEPER, L.; HEUWIESER, W.; BORCHARDT, S. Association of postpartum hypocalcemia with early-lactation milk yield, reproductive performance, and culling in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 10, p. 9396–9405, 2018.

VIEIRA-NETO, A.; LEÃO, I.M.R.; PRIM, J.G.; SILVA, A.C.M.; MARINHO, M.N.; ZIMPEL, R.; ETHEVE, S.; NELSON, C.D.; SANTOS, J.E.P. Effect of duration of exposure to diets differing in dietary cation-anion difference on Ca metabolism after a parathyroid hormone challenge in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 1, p. 1018–1038, 2021.

WANKHADE, P.R.; MANIMARAN, A.; KUMARESAN, A.; JEYAKUMAR, S.; RAMESHA, K.P.; SEJIAN, V.; RAJENDRAN, D.; VARGHESE, M.R. Metabolic and immunological changes in transition dairy cows: A review. **Veterinary World**, v. 10, n. 11, p. 1367–1377, 2017.

WEISS, W. P.; AZEM, E.; STEINBERG, W.; REINHARDT, T.A. Effect of feeding 25-hydroxyvitamin D₃ with a negative cation-anion difference diet on calcium and vitamin D status of periparturient cows and their calves. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 8, p. 5588–5600, 2015.

ZIMPEL, R.; POINDEXTER, M.B.; VIEIRA-NETO, A.; BLOCK, E.; NELSON, C.D.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Effect of dietary cation-anion difference on acid-base status and dry matter intake in dry pregnant cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 9, p. 8461–8475, 2018.

CAPÍTULO II

Sumário interpretativo: *De acordo com Silva et al.* A vitamina D participa de diversos processos fisiológicos e está diretamente relacionada com a homeostase do Ca. O colecalciferol é sintetizado na pele através da reação química do ergosterol com a luz solar. No fígado esse metabólito é convertido em calcidiol, que por sua vez é hidroxilado nos rins pela 1- α hidroxilase para formar o metabólito ativo da vitamina D (calcitriol). Em resumo, os resultados do presente estudo mostraram que a suplementação com 3,0 mg/dia de calcidiol, associada à dieta acidogênica nos 21 dias pré-parto, melhora o metabolismo de Ca, aumenta a excreção de Ca na urina e a concentração de cálcio no soro. Calcidiol aumenta as produções de colostro e de leite, de leite corrigido para gordura e energia e reduz o balanço energético negativo no terço inicial de lactação.

25-HIDROXIVITAMINA D₃ PARA VACAS LEITEIRAS

25-hidroxitamina-D₃ associada à dieta acidogênica melhora o metabolismo energético e o desempenho de vacas leiteiras

A. S. Silva¹, C. S. Cortinhas², T. S. Acedo², M. J. F. Morenz³, F. C. F. Lopes³, M. B. Arrigoni¹, M. H. Ferreira⁴, and T. L. Jaguaribe⁴

¹São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, 18618-68, Brazil

²DSM Nutritional Products, São Paulo, SP, 01451-905, Brazil

³Embrapa Dairy Cattle, Juiz de Fora, MG, 36038-330, Brazil

⁴Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 36036900, Brazil

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação na dieta acidogênica de calcidiol nos minerais e metabólitos no sangue, balanço mineral, incidência de doenças no pós-parto, perfil hematológico, comportamento ingestivo, balanço de energia, e produção de leite em vacas leiteiras da raça Holandês. Foram utilizadas 40 vacas múltiparas com peso corporal de (PC), escore de condição corporal (ECC), número de lactações e produção média na lactação anterior, respectivamente, (média \pm desvio padrão) de $661,2 \pm 59,18$ kg; $3,46 \pm 0,35$; $1,7 \pm 0,86$; e $33,1 \pm 6,42$ kg/dia, que foram distribuídas aleatoriamente em delineamento em blocos ao acaso, com repetições dentro de blocos (vacas). Os blocos foram considerados como o período de entrada dos animais no experimento. As vacas ($n = 20$ para cada tratamento) foram alocadas dentro dos blocos, 30 dias antes da data prevista do parto e receberam uma dieta basal acidogênica (373 g/kg de FDN e 136 g/kg de PB; base na matéria seca; Diferença cátion-aniônica (DCAD) = -110 mEq/kg de MS)) em que os tratamentos foram: i) suplementação com colecalciferol (CTRL) na concentração de 3,0 mg/dia; e ii) suplementação com calcidiol (CA) na concentração de 3,0 mg/dia (Rovimix HyD, DSM Produtos Nutricionais, São Paulo, Brasil). As dietas experimentais foram fornecidas 30 dias antes da data prevista do parto. Após o parto, todas as vacas receberam a mesma dieta até o 50º dia da lactação. Amostras de sangue foram coletadas nos dias -7 , 0 , 1 , 2 , 7 , 21 e 42 relativos ao parto. Não houve efeito de tratamento para o Ca ionizado (iCa) no pré-parto (-7 d). Entretanto, uma tendência de aumento no iCa foi observada no pós-parto nas vacas do tratamento calcidiol ($+0,07$ mM). As vacas do tratamento calcidiol apresentaram maior concentração de 25-OH-D₃ no plasma (CTRL = $66,6$ vs. CA = $245,3$ ng/mL). As vacas suplementadas com calcidiol excretaram mais Ca na urina (mg/L) (CTRL = $345,0$ vs. CA = $448,3$ mg/L), assim como 60% mais Ca por dia ($+4,82$ g/dia). A suplementação com calcidiol aumentou o volume globular (CTRL = $28,5$ vs. CA = $31,8$ %). Houve tendência de aumento

(+1,0 kg/dia) para as vacas suplementadas com calcidiol no consumo de matéria seca - CMS. O calcidiol aumentou a produção de colostro (+2,1 kg) e a concentração de glicose no plasma no dia do parto (CTRL = 3,18 vs. CA = 3,63 mM). A concentração de ácidos graxos não esterificados - AGNE no plasma foi menor nas vacas do tratamento CA (CTRL = 0,43 vs. CA = 0,32 mM). A suplementação com calcidiol aumentou a produção de leite (CTRL = 29,7 vs. CA = 32,5 kg/dia), leite corrigido para gordura (CTRL = 29,1 vs. CA = 33,9 kg/dia) e leite corrigido para energia (CTRL = 29,3 vs. CA = 32,4 kg/dia). Houve tendência de aumento da ingestão calórica para o grupo calcidiol. Houve tendência para aumento da energia líquida secretada no leite (CTRL = $19,9 \pm 0,69$ vs. CA = $21,7 \pm 0,69$ Mcal/dia). A suplementação de vacas leiteiras nos últimos 21 dias pré-parto com calcidiol melhorou o metabolismo ósseo e aumentou a excreção de Ca na urina; aumentou a produção de colostro e a concentração de glicose no dia do parto; melhorou o metabolismo energético e aumentou a produção de leite, leite corrigido para gordura e energia, e a produção dos constituintes do leite.

Palavras-chave: dieta pré-parto, excreção urinária, glicose, homeostase do cálcio, período de transição

INTRODUÇÃO

A hipocalcemia subclínica acomete cerca de 50% de vacas leiteiras (Reinhardt et al., 2011), causando diminuição dos índices produtivos e reprodutivos (Martinez et al., 2012). Com o intuito de diminuir a incidência de hipocalcemia subclínica, a estratégia mais utilizada é o fornecimento de dietas acidogênicas no período pré-parto (Lopera et al., 2018; Santos et al., 2019), visando diminuir o pH sanguíneo com o intuito de promover aumento das concentrações de Ca no sangue (Martinez et al., 2018a).

O uso de dietas acidogênicas no pré-parto visando causar acidose metabólica moderada tem sido recomendado (Diehl et al., 2018; Glosson et al., 2020) e a associação com

a suplementação de metabólito ativo da vitamina D pode promover melhora nos mecanismos regulatórios do Ca sanguíneo, refletindo em um metabolismo ósseo e mineral integrado (Rodney et al., 2018a). Estudos recentes têm sido conduzidos com o objetivo de avaliar alternativas nutricionais para prevenção da hipocalcemia, como a utilização de outros metabólitos da vitamina D (Guo et al., 2018; Vieira-Neto et al., 2017; Weiss et al., 2015), associadas ou não à dietas acidogênicas (Martinez et al., 2018a; Rodney et al., 2018a).

Tradicionalmente, a fonte mais utilizada de vitamina D em fazendas leiteiras é o colecalciferol. O NRC (2001) recomenda a utilização de 0,5 mg/dia para vacas com peso de 650 kg. Esse metabólito da vitamina D se encontra inativo e necessita sofrer hidroxilação no fígado para formar o 25-hidroxivitamina-D₃ e ser novamente convertida nos rins em 1,25-dihidroxivitamina-D₃ que é a forma ativa da vitamina D (Horst et al., 1994). Conquanto, a suplementação com colecalciferol não tem se mostrado eficiente na manutenção dos níveis de Ca no sangue ao ponto de prevenir a ocorrência de hipocalcemia (Martinez et al., 2018b; Wilkens et al., 2012).

Poindexter et al. (2020) avaliaram os efeitos da suplementação de 1,0 ou 3,0 mg/dia de colecalciferol ou calcidiol em dieta acidogênica (-138 mEq/kg de MS) e observaram que 3,0 mg/dia de calcidiol (25-hidroxivitamina-D₃) foi eficiente para aumentar a concentração de Ca no sangue (+0,07 mM) e melhorar a resposta imune. Martinez et al. (2018b) avaliaram a utilização de 3,0 mg/dia de colecalciferol ou calcidiol para vacas leiteiras em dieta acidogênica durante 21 dias antes do parto e observaram efeito positivo do calcidiol na redução da incidência de retenção de placenta e metrite e aumento na produção de leite (+3,5 kg/dia). A utilização de 6,0 mg/dia de calcidiol apresenta mais efeitos deletérios que positivos, resultando em maior incidência de hipocalcemia clínica (Weiss et al., 2015). Contudo, estes estudos foram conduzidos em condições de clima temperado, com nível de produção diferente e menor necessidade de uso de sais acidogênicos para promover redução

do pH sanguíneo. Além disso, as dietas produzidas em clima tropical apresentam elevada concentração de potássio (**K**), dificultando a formulação de dietas específicas do período de transição em vacas leiteiras. Para nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo utilizando exclusivamente uma dieta acidogênica associada à suplementação na dieta de 3,0 mg/dia de colecalciferol ou calcidiol para vacas leiteiras no período pré-parto.

Nessa perspectiva, a hipótese do presente estudo é de que a suplementação com calcidiol para vacas leiteiras, associada a uma dieta acidogênica aumenta as concentrações séricas de Ca, melhora o metabolismo mineral e diminui a incidência de doenças no pós-parto. Devido à diminuição do desequilíbrio dos mecanismos homeostáticos do Ca no período de transição, o calcidiol pode melhorar o desempenho produtivo e reprodutivo e reduzir a incidência de doenças no pós-parto.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da suplementação na dieta acidogênica de calcidiol nos minerais e metabólitos no sangue, balanço mineral, incidência de doenças no pós-parto, perfil hematológico, comportamento ingestivo, balanço de energia, e produção de leite em vacas leiteiras da raça Holandês.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Campo Experimental José Henrique Bruschi, pertencente à Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronal Pacheco, Minas Gerais, Brasil (21°33'22"S, 43°06'15"W). O clima da região é do tipo Cwa (mesotérmico), segundo classificação de Köppen, com verão quente e chuvoso e inverno frio e seco. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais - CEUA da Embrapa Gado de Leite (Protocolo n°. 7946051218).

Foram utilizadas 40 vacas multíparas da raça Holandês, com peso corporal (**PC**), escore de condição corporal (**ECC**), número de lactações e produção média na lactação anterior, respectivamente, (média \pm desvio padrão) de $661,2 \pm 59,18$ kg; $3,46 \pm 0,35$; $1,7 \pm 0,86$; e $33,1 \pm 6,42$ kg/dia de leite.

Os animais foram distribuídos em delineamento em blocos ao acaso, com repetições dentro dos blocos (vacas; $n = 20$ em cada tratamento), sendo os blocos considerados como o período de entrada dos animais no experimento. As vacas foram alocadas dentro dos blocos, 30 dias antes da data prevista do parto, e receberam dieta basal acidogênica (373 g/kg de FDN e 135 g/kg de PB com base na matéria seca - MS; diferença cátion-aniônica (DCAD) = -110 mEq/kg de MS), sendo avaliados dois tratamentos: i) suplementação com colecalciferol na concentração de 3,0 mg/dia (Rovimix D₃ 500[®], DSM Nutritional Products, Basel, Switzerland); e ii) suplementação com calcidiol na concentração de 3,0 mg/dia (Rovimix HyD[®], DSM Nutritional Products, Basel, Switzerland). O período que os animais permaneceram na dieta acidogênica foi de $20,9 \pm 5,69$ dias. Os tratamentos colecalciferol e calcidiol foram descritos como controle (**CTRL**) e calcidiol (**CA**), respectivamente, enquanto que no plasma, o calcidiol foi descrito como 25-hidroxivitamina D₃ (25-OH-D₃).

Os animais foram alocados em galpão do tipo *freestall* com camas de borracha cobertas com serragem, e providos de dispositivos eletrônicos (alimentadores, bebedouros e plataforma de pesagem automáticos) (Intergado[®], Betim, MG, Brasil) e sistema de resfriamento composto de ventiladores e aspersores na linha de alimentação, com ativação automática (Delaval[®], Jaguariúna, SP, Brasil).

As dietas experimentais foram fornecidas uma vez ao dia, aproximadamente às 08:00 horas nos 30 dias antes da data prevista do parto até o dia do parto e duas vezes ao dia no pós-parto, às 08:00 e 15:30 horas. Após o parto, todas as vacas receberam a mesma dieta de lactação (Tabela 1), fornecida como dieta total (NRC, 2001), até o 49º dia da lactação. As

sobras foram pesadas diariamente, antes do fornecimento da dieta, com o objetivo de atingir 5% de sobras.

Tabela 1. Proporção e composição química das dietas experimentais

Item	Dieta pré-parto	Dieta lactação
Ingrediente, g/kg de MS		
Silagem de milho	744,5	300,0
Feno de Tifton	93,7	45,0
Farelo de soja	136,7	205,0
Milho grão moído	-	305,0
Caroço de algodão	-	112,0
Mistura mineral pré-parto ³	25,1	-
Mistura mineral pós-parto ⁴	-	33,0
MS, %		
	38,5 ± 2,9	53,3 ± 1,7
Nutrientes, % da MS (± DP)		
ELI ⁵	1,59 ± 0,08	1,51 ± 0,1
MO, %	92,6 ± 1,30	92,9 ± 0,70
PB, %	13,7 ± 2,1	16,8 ± 1,3

CNF ⁶ , %	37,2 ± 4,4	41,8 ± 3,2
FDN, %	36,8 ± 3,7	28,9 ± 2,8
Ca, %	0,53 ± 0,13	0,68 ± 0,10
P, %	0,27 ± 0,09	0,41 ± 0,14
Mg, %	0,22 ± 0,01	0,27 ± 0,05
K, %	0,87 ± 0,09	1,11 ± 0,14
Cl, %	0,48	-
Na, %	0,09	-
S, %	0,38	-
DCAD ⁷ , mEq/kg de MS	-110	275,0

¹Vacas no pré-parto recebendo uma dieta acidogênica (DCAD = -110 mEq/kg de MS), 30 dias antes do parto previsto. Dentro de cada tratamento, as vacas foram suplementadas com 3,0 mg/dia de colecalciferol ou 3,0 mg/dia de calcidiol. Tratamentos: CTRL (Controle): 3,0 mg/dia de colecalciferol (Rovimix D₃ 500[®], DSM Nutritional Products); CA: 3,0 mg/dia de calcidiol (Rovimix HyD[®], DSM Nutritional Products).

²Item: MS = matéria seca; ELI = energia líquida para lactação; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; CNF = carboidratos não fibrosos; FDN = fibra em detergente neutro; Ca = cálcio; P = fósforo; Mg = magnésio; K = potássio; Cl = cloro; Na = sódio; S = enxofre.

³Mistura mineral pré-parto: cada kg contém: 105 g de Ca, 25 g de P, 100 g de S, 40 g de Mg, 25,35 de Na, 130 g de Cl, 12 mg de Co, 600 mg de Cu, 30 mg of Cr, 600 mg de Fe, 60 mg de I, 1.600 mg de Mn, 16 mg de Se, 2.400 mg de Zn, 480.000 UI de vitamina A, 12.000 UI de vitamina E, 80 mg de biotina, 1,5 x10⁹ UFC de *Saccharomyces cerevisiae*, 250 mg de F.

⁴Mistura mineral pós-parto: cada kg contém: 105 g de Ca, 35 g de P, 18 g de S, 36.5 g de Mg, 50 g de K, 107.25 de Na, 11.8 mg de Co, 415 mg de Cu, 16.5 mg de Cr, 875 mg de Fe, 17.5 mg de I, 1,165 mg de Mn, 15 mg de

Se, 2,330 mg de Zn, 170,000 UI de vitamina A, 60,000 UI de vitamina D₃, 1,000 UI de vitamina E, 66.5 mg de biotina, 1.25 x10⁹ CFU de *Saccharomyces cerevisiae*.

⁵Calculada com base na análise bromatológica dos ingredientes, usando o NRC (2001), para uma ingestão de MS prevista de 11,0 kg/dia no pré- e 18 kg/dia no pós-parto.

⁶Calculado usando a equação: MS – [PB + FDN + extrato etéreo + cinzas – (FDN corrigida para cinzas e proteína)].

⁷DCAD = diferença cátion-aniônica da dieta, calculada usando a equação: [(mEq de Na + mEq de K) – (mEq de Cl + mEq de S)].

Análises Químicas e densidade energética das dietas

As amostras das dietas (oferecida e sobras individuais) foram coletadas diariamente, pré-secadas em estufa de ventilação forçada (55°C; 72 horas) e moídas em moinho de facas, equipado com peneira com abertura de malhas de 1–mm (Wiley mill; A. H. Thomas, Philadelphia, PA).

Foram coletadas diariamente amostras das dietas e das sobras. As sobras individuais e as dietas foram posteriormente misturadas para compor uma amostra composta semanal (base da matéria pré-secada). Em seguida, estas amostras foram enviadas ao laboratório (Laboratório de Análise de alimentos, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil) para a determinação da composição químico-bromatológica.

As amostras foram analisadas para determinação dos teores de matéria seca (**MS**), matéria orgânica (**OM**), nitrogênio total (**NT**), e extrato etéreo (**EE**), de acordo com os métodos 930,15, 942,05, 984,13 e 920,39, respectivamente (AOAC, 2005). O cálculo do teor de proteína bruta (**PB**) foi realizado multiplicando a concentração do NT pelo fator 6,25. As concentrações de fibra em detergente neutro (**FDN**) e fibra em detergente ácido (**FDA**) foram determinadas sequencialmente usando o equipamento Ankom 220 Fiber Analyzer (Ankom

Technology, Fairport, USA). Para determinar a FDN, foi utilizada amilase termoestável sem a adição de sulfito de sódio. Os carboidratos não fibrosos (**CNF**) foram determinados por diferença, por meio da equação:

$$\text{CNF} = 100 - \text{PB} + \text{FDN} + \text{EE} + \text{cinzas} - (\text{FDN corrigida para cinzas e proteína})$$

A densidade energética das dietas foi estimada por meio de análise química dos ingredientes da dieta, calculada para 11,0 e 20,0 kg de consumo de matéria seca (**CMS**) para os períodos pré- e pós-parto, respectivamente, utilizando-se o modelo do NRC (2001).

Coleta e Processamento do Sangue

As amostras de sangue foram coletadas após a alimentação matinal entre 08:00 h e 10:00 h, por punção da veia ou artéria coccígea em tubos evacuados (Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA), sem agentes anticoagulantes para a separação do soro e com K₃-EDTA para a separação do plasma. Posteriormente, os tubos foram centrifugados ((15 min; 2500 x g para as análises de minerais e paratormônio (**PTH**) por 10 min; 1800 x g para as análises de 25-OH-D₃) (LS-3 Plus, CELM[®] São Paulo, SP, Brasil) para separação do plasma, que foi colhido e dividido em múltiplas alíquotas acondicionadas em tubos (2,5 mL), e congeladas a -20°C até a realização das análises de glicose, insulina, ácidos graxos não esterificados, β-hidroxibutirato e PTH. As amostras de minerais no soro foram imediatamente levadas ao laboratório para realização das análises. As amostras para determinação de 25-OH-D₃ no plasma foram congeladas a -80°C até as análises.

Concentrações Séricas de Ca, Mg, P e de Ca ionizável (iCa)

Após a centrifugação e separação do soro, as amostras foram enviadas imediatamente para o laboratório para determinação das concentrações dos minerais. As concentrações de cálcio total (**tCa**), magnésio total (**tMg**) e fósforo total (**tP**), bem como de Ca ionizável (**iCa**), foram determinadas em amostras de soro coletadas nos dias -7, 0, 1, 2 e 21 após o parto. A

determinação dos teores dos minerais no soro foram realizadas por meio de espectrofotometria pela técnica do íon seletivo em analisador automático de íons MHLab-ise (MH Equipamentos e Materiais para Laboratório Ltda, São Paulo, SP, Brasil).

Concentração Plasmática de 25-OH-D₃ e Paratormônio

As amostras de plasma coletadas no 21° dia após o início do fornecimento das dietas experimentais, no dia do parto (d0), e no 21° dia (d21) após o parto foram congeladas em temperatura -80° e enviadas ao laboratório para a determinação das concentrações de 25-OH-D₃, por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) pelo laboratório LabFor Análises Laboratoriais Ltda (LabFor[®], São Paulo, SP, Brasil). O plasma amostrado aos -7, 0 e 21 dias em relação ao parto, foi analisado para a determinação das concentrações de PTH, através do método da quimioluminescência (VetLab[®], Petrópolis, RJ, Brasil). Os dados de PTH foram log-transformados antes da análise, porque a heterocedasticidade ou os resíduos não apresentaram distribuição normal.

Glicose, Insulina, Ácidos Graxos não Esterificados e β-hidroxibutirato no Plasma

Foram coletadas amostras de sangue para a avaliação das concentrações plasmáticas de glicose, insulina, ácidos graxos não esterificados (AGNE) e β-hidroxibutirato (BHB) nos dias -7, 0, 7 e 21 em relação ao parto. As concentrações de glicose no plasma foram analisadas por oxidação da glicose utilizando kits comerciais (Glicose PAP Liquiform, Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), usando um espectrofotômetro de microplacas EON da Biotek com *software* de interfase Gen5 (Biotek[®], Winooski, EUA). A determinação das concentrações de AGNE e BHB foi realizada por meio do kit analítico RANDOX (Randox Laboratories Ltd., County Antrim, Reino Unido) usando o ensaio enzimático-calorimétrico. Os coeficientes de variação (CV) intra e inter-ensaio foram de 3,90 e 3,85% para a glicose, respectivamente. A recomendação de iCa ≤1,0 mM foi utilizada para

diagnosticar hipocalcemia subclínica (Oetzel et al., 1988). A cetose foi definida como concentração de BHB >1,2 mM, baseado no estudo de Martinez et al. (2016).

Hemograma

As amostras de sangue total coletadas no dia -30 da data prevista do parto e, novamente, nos dias 2 e 7 após o parto, foram enviadas ao laboratório para a realização do hemograma. As análises de hematologia global e contagem de células diferenciais foram realizadas em analisador hematológico automático (VET MEK-6550J/K, Nihon Kohden Corporation, Irvine, CA, EUA). A coleta de sangue total no dia da entrada dos animais (-30) no experimento foi usada como co-variável para realização das análises estatísticas.

Coleta e Análise de Urina

Amostras de urina foram coletadas duas vezes por semana antes do parto e no 21^a e 42^a dia pós-parto, por meio de massagem da área perineal para estimular a micção. Logo após a coleta, o pH foi medido com potenciômetro digital portátil (MS Tecnopon[®], MPA 210, Piracicaba, SP, Brasil) e em seguida, as amostras foram colocadas em tubos de plástico em gelo e enviadas ao laboratório para análises das concentrações de creatinina, Ca e Mg totais. As análises de creatinina na urina foram realizadas por meio de método colorimétrico comercial (Labtest, REF. 35, Lagoa Santa, MG, Brasil). As análises de Ca e Mg na urina foram realizadas por meio de espectrofotometria utilizando o analisador automático Labmax Plenno (Labtest, REF. 35, Lagoa Santa, MG, Brasil).

A creatinina foi usada como indicador para estimar o volume urinário diário com base na excreção constante de 24,04 mg de creatinina por kg de PC por dia (Chizotti et al., 2008).

A estimativa da produção diária de urina foi calculada da seguinte forma:

$$\frac{PC (kg) \times 24,04}{\text{concentração de creatinina na amostra de urina (mg/L)}}$$

As excreções urinárias diárias de Ca e Mg foram calculadas como o produto do volume urinário e as respectivas concentrações desses minerais nas amostras de urina.

Balanço Mineral Estimado

Os valores estimados de Ca e Mg foram calculados na última semana de gestação e no dia do parto, com base no CMS, concentrações de Ca e Mg nas dietas e sobras, perdas urinárias de Ca e Mg, e teores de Ca e Mg no colostro. As absorções estimadas de acúmulo de Ca e Mg e tecido fetal foram calculadas, utilizando as recomendações do NRC (2001), de acordo com a dieta e o peso do bezerro ao nascimento. Para a determinação dos minerais nas dietas, 1,0 g de amostra foi incinerada a 525 °C por oito horas. Então, o resíduo foi dissolvido em 6,0 mL de ácido nítrico (HNO₃) com 25 g/L de HClO₄ (digestão nitroperclórica) (Sarruge e Haag, 1974), sendo a determinação da concentração de minerais nas dietas foi feito por meio de espectrofotômetro de absorção atômica (Spectra AA 800, Varian, EUA).

Monitoramento de Doenças Clínicas

As vacas foram observadas durante todo o período experimental, sendo que os animais que apresentaram qualquer sintoma anormal, ou diminuição substancial no CMS ou na produção de leite, foram submetidos a exames adicionais, para o diagnóstico de doenças clínicas nos dias 4, 7 e 14 pós-parto. A distocia foi registrada quando o parto necessitou de assistência. A retenção de placenta foi diagnosticada após 12 horas sem a expulsão das membranas fetais. O diagnóstico de mastite foi realizado por meio da presença de anormalidades no leite com o auxílio de caneca telada de fundo preto e presença de grumos. O diagnóstico de metrite foi realizado por palpação retal, e confirmado quando o útero apresentou-se dilatado e flácido, com presença de descarga aquosa, fétida de cor avermelhada ou castanha e temperatura retal maior que 39,2°C (Smith et al., 1998).

Monitoramento da Ruminação

Durante todo o período experimental, a ruminação e a atividade foram monitoradas por colares SCR Heatime[®] Allflex (SCR Allflex, Hadarim, Netanya, Israel). A ruminação total foi mensurada utilizando o sistema de monitoramento de ruminação Hr-Tag (SCR Engineers, Netanya, Israel). O sistema apresenta registradores de ruminação e atividade, leitores estacionários e *software* para processamento dos dados eletrônicos (Data Flow software, SCR Engineers, Netanya, Israel). Foram colocados colares no pescoço de todos os animais com o logger posicionado no lado esquerdo. O logger consistia em um em um acelerômetro, uma unidade de microprocessador, uma unidade de memória e um transponder. Os dados foram calculados e resumidos em intervalos de 2 horas e armazenados na memória do registrador. Para realização da análise estatística, a média de ruminação diária foi considerada na última semana pré-parto até a sexta semana pós-parto. O consumo de água foi registrado diariamente em dispositivos eletrônicos e armazenados (Intergado[®], Betim, MG, Brasil). Então foi realizada a média de consumo de água da semana para análise estatística. As taxas de CMS e água foram determinadas através dos dados de CMS e água em relação ao total de tempo dispendido para consumo de MS e água.

Peso Corporal, Escore de Condição Corporal (ECC)

O ECC foi avaliado semanalmente no pré-parto e nos primeiros 50 dias pós-parto por um único avaliador treinado, utilizando escala de 1 a 5 (Ferguson et al., 1994) com incrementos de 0,25 unidades (Elanco Animal Health, 2009). As vacas foram pesadas no dia da entrada no experimento e, automaticamente, durante todo o período experimental, quando acessaram os bebedouros dotados de plataforma de pesagem automática (Intergado[®], Betim, MG, Brasil).

Produção e Composição do Colostro e do Leite

As vacas foram ordenhadas nas primeiras seis horas após o parto, sendo a produção de colostro registrada. Posteriormente, foram coletadas amostras de colostro em duplicata e enviadas ao laboratório (Laboratório de Qualidade do Leite, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil) para a determinação das concentrações de cálcio (**Ca**) e magnésio (**Mg**) totais, de acordo com metodologia descrita por Bird e Weber (1961).

As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia às 07:00 h e às 16:00 h, e a produção de leite individual foi registrada automaticamente, por meio do *software* Delpro Manager System (Delpro, DeLaval, Tumba, Suécia), instalado na ordenha mecanizada tipo espinha-de-peixe (4 x 4) de circuito fechado, com linha baixa centralizada, equipada com contadores de leite automáticos MM23, controles MPC 580/680, e removedor automático de coletores para amostragem do leite. Amostras individuais de leite foram coletadas três vezes por semana durante todo o período experimental, e enviadas ao Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de leite (Juiz de Fora, MG, Brasil) para a determinação das concentrações de gordura, proteína, lactose e nitrogênio ureico no leite. As amostras foram armazenadas a 5°C com bronopol para preservação do leite e analisadas através do método de espectrometria de absorção no infravermelho médio, utilizando o equipamento Bentley FCM (Bentley Instruments, Minnesota, EUA). Também foi avaliada a produção de leite corrigida para o teor de gordura (**3,5%LCG**) e para a energia (**LCE**) e energia líquida retida no leite (**ELI**), segundo o NRC (2001), sendo:

$$3,5\% \text{ LCG} = 0,4324 \times \text{leite kg} + (16,218 \times \text{gordura no leite kg});$$

$$\text{LCE} = [(0,3246 \times \text{produção de leite}) + (12,86 \times \text{produção de gordura}) + (7,04 \times \text{produção de proteína})];$$

$$\text{ELI} = (0,0929 \times \text{gordura \%}) + (0,0563 \times \text{proteína \%}) + (0,0395 \times \text{lactose \%}).$$

Balanço Energético Líquido

O balanço de energia foi calculado utilizando a ingestão calórica diária obtida a partir da ingestão de MS e o conteúdo energético das dietas, de acordo com o NRC (2001). As exigências de manutenção foram calculadas com base na fórmula do NRC (2001), de acordo com peso corporal metabólico ($0,08 \times PC^{0,75}$). As necessidades calóricas para gestação dos animais no pré-parto foram estimadas como sendo 3,7 Mcal de EL_1 /dia para um bezerro com 43 kg de peso ao nascimento (NRC, 2001). As calorias secretadas no leite foram calculadas de acordo com as produções de gordura, proteína e lactose {produção de leite \times [(0,0929 \times gordura %) + (0,0563 \times proteína %) + (0,0395 \times lactose %)]}, de acordo com o NRC (2001).

Procedimentos Estatísticos

Os dados foram analisados para os períodos pré e pós-parto, separadamente. Foi realizado o teste de normalidade dos resíduos (Shapiro Wilk; $P \leq 0,10$) para cada variável dependente. As variáveis que não apresentarem distribuição normal foram submetidas à transformação por meio do procedimento Box-Cox (Box e Cox, 1964). Os dados de PTH, eosinófilos, linfócitos e monócitos foram log-transformados antes da análise, porque a heterocedasticidade ou os resíduos não apresentaram distribuição normal. Os dados foram analisados utilizando-se modelos mistos, sendo a semana ou dia de coleta usados como medida repetida no tempo, usando o procedimento MIXED do SAS 9,4 (SAS Institute Inc., Cary, NC; 2013). A coleta de sangue total no d30 relativo ao parto foi usada como covariável para análise dos dados de hematologia. O dia de coleta foi usado como medida repetida no tempo para as análises de iCa, Ca, P, Mg, PTH, 25-OH-D₃, produção de urina e excreção de creatinina, Ca e Mg na urina. Os dados de incidências de doenças e desempenho reprodutivo foram considerados durante todo o período experimental. Os dados de produção de colostro e a concentração de Ca e Mg no colostro foram avaliados no dia do parto. Os dados de balanço energético no pré-parto foram considerados na última semana antes do parto. A semana de

lactação foi usada como medida repetida no tempo para os dados de balanço energético pós-parto, produção de leite e ruminção.

Os dados não paramétricos (retenção de placenta, distocia, metrite, mastite e reprodução) foram analisados usando o modelo de regressão logística, usando o procedimento LOGISTIC do SAS e os resultados foram interpretados com seus respectivos intervalos de confiança a 95%.

Foram realizadas correlações de Pearson através do procedimento CORR do SAS para as variáveis iCa, tCa, tMg, Mg e Ca secretado no colostro e urina, 25-OH-D₃, balanço de Ca e Mg, glicose, BHB e produção de leite a 95% de intervalo de confiança.

Foram considerados como efeitos fixos as dietas, as semanas e suas interações, e como efeitos aleatórios os blocos, os animais aninhados dentro de bloco e o erro. As médias para os fatores dieta e semana, foram estudadas por meio do teste t e por regressão, respectivamente, considerando-se $P < 0,05$ e tendência foi considerada quando $P > 0,05 \leq 0,10$.

RESULTADOS

Concentrações sanguíneas de Ca ionizado, Ca total, Mg total, P total, 25-OH-D₃ e PTH

Não houve efeito de tratamento para a concentração de iCa no pré-parto (-7d) ($P = 0,40$). Entretanto, houve significância marginal ($P = 0,053$) na concentração de iCa foi observada no pós-parto nas vacas do tratamento calcidiol (CTRL = $1,24 \pm 0,029$ vs. CA = $1,31 \pm 0,032$ mM;), bem como houve tendência de efeito do tempo de coleta ($P = 0,09$) com maior concentração de iCa no soro no primeiro dia pós-parto. Não houve efeito de interação entre a fonte de vitamina D e o dia de coleta ($P = 0,38$). As concentrações de tCa e tP no soro não foram influenciadas pela fonte de vitamina D na dieta ($P > 0,05$), mas, a concentração de tCa diminuiu após o parto, apresentando o menor valor no dia 21 pós-parto ($P = 0,01$), ao

passo que a concentração de tP teve aumento significativo no dia 2 pós-parto ($P < 0,01$). Efeito de interação não foi detectado ($P > 0,05$) para tCa e tP. A concentração de Mg no soro não foi afetada pela fonte de vitamina D ($P = 0,41$), dia da coleta ($P = 0,32$) ou interação entre a fonte de vitamina D e o dia da coleta ($P = 0,26$). Não houve efeito de tratamento para a concentração de PTH no plasma ($P = 0,16$). A concentração de PTH foi maior no pós-parto ($P < 0,0001$) e não foi detectado efeito de interação entre a fonte de vitamina D e o dia de coleta ($P = 0,53$) (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações séricas de cálcio ionizado, cálcio total, fósforo e magnésio totais e nas concentrações de 25-hidroxivitamina-D₃ (25-OH-D₃) e paratormônio (PTH) no plasma de vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol

Item	Tratamento ¹		EPM ²	Valor de P ³		
	CTRL	CA		Vitamina D	Dia	Vitamina D x Dia
	mmol/L					
Pré-parto iCa	1,31	1,34	0,026	0,40	-	-
Pós-parto iCa	1,24	1,31	0,031	0,053	0,09	0,38
Ca total	2,41	2,47	0,04	0,22	<0,01	0,62
P total	2,22	2,17	0,07	0,57	<0,01	0,41
Mg total	1,07	0,99	0,07	0,41	0,32	0,26
25-OH-D ₃ , ng/mL	66,60	245,30	2,06	<0,01	<0,01	<0,01
PTH, pg/mL	11,58	12,16	1,398	0,16	<0,0001	0,53

¹Tratamentos: CTRL: 3,0 mg/dia de colecalciferol (Rovimix D₃ 500[®], DSM Nutritional Products); e CA: 3,0 mg/dia de calcidiol (Rovimix HyD[®], DSM Nutritional Products).

²EPM = erro-padrão da média.

³Valor de *P*: *P* Trat = efeito da fonte de vitamina D; *P* Dia = efeito do dia da coleta; *P* Trat x Dia = interação entre tratamento e dia de coleta.

As vacas do tratamento calcidiol apresentaram maior concentração de 25-OH-D₃ no plasma (*P* < 0,01) (CTRL = 66,6 vs. CA = 245,3 ng/mL). Houve efeito de tempo de coleta (*P* < 0,01). Efeito de interação entre a fonte de vitamina D e dia de coleta foi detectado (*P* < 0,01) (Tabela 2), onde a maior concentração plasmática de 25-OH-D₃ foi observada no dia do parto, ao passo que no tratamento controle foram observadas concentrações de 25-OH-D₃ semelhantes ao longo dos dias de coleta (Figura 1).

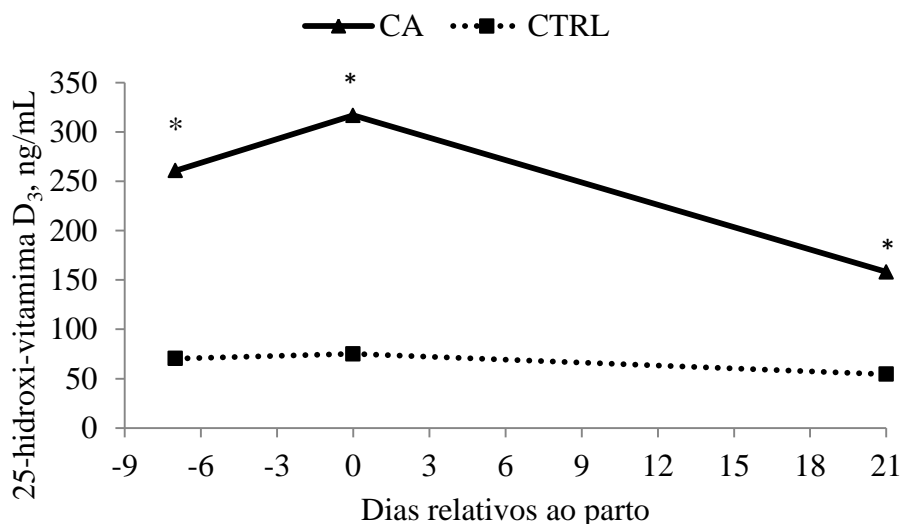


Figura 1. 25-hidroxi-vitamina-D₃ no plasma de vacas da raça Holandês recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementadas com colecalciferol (CTRL) ou calcidiol (CA). Efeito da fonte de vitamina D (*P* < 0,01); efeito do dia de coleta (*P* < 0,01); * denota interação entre a fonte de vitamina D e o dia de coleta (*P* < 0,01).

Excreção de Minerais na Urina: Pré e Pós-parto

A fonte de vitamina D não influenciou a excreção urinária de creatinina ($P = 0,67$) e a produção de urina no pré-parto ($P = 0,54$). No entanto, no tratamento calcidiol houve maior excreção de Ca na urina (mg/L) ($P = 0,03$), assim como o Ca excretado por dia (+ 60%) ($P = 0,0002$). A excreção de Mg expressa em mg/L ($P = 0,51$) ou g/dia ($P = 0,52$) não foi influenciada pela fonte de vitamina D, bem como não houve efeito de tratamento no pH urinário no pré-parto ($P = 0,25$) (Tabela 3). Assim como ocorreu no pré-parto, a concentração de creatinina ($P = 0,38$) e a produção diária de urina ($P = 0,41$) não foram influenciadas pela fonte de vitamina D no pós-parto. Não houve efeito de dia de coleta para a excreção de creatinina ($P = 0,23$) e produção de urina diária ($P = 0,23$). Contudo, maior excreção de Ca (mg/L) ocorreu no dia 21 em comparação à do dia 42 pós-parto ($P = 0,03$). Houve tendência para efeito de dia de coleta para Ca excretado (g/dia) ($P = 0,06$). Efeito de interação não foi observado para concentração de creatinina ($P = 0,33$), volume de urina ($P = 0,34$), concentração de Ca (mg/L) ($P = 0,69$), e excreções de Ca ($P = 0,52$) e Mg (g/dia) ($P = 0,96$). Houve interação ($P = 0,019$) entre a fonte de vitamina D e o tempo de coleta para a excreção de Mg expressa em mg/L, sendo que no dia 42º dia pós-parto, houve maior excreção de Mg no tratamento controle (Tabela 3).

Tabela 3. Volume urinário e concentrações de creatinina, Ca e Mg na urina em vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol

Item	Tratamento ¹			Valor de P ³		
	CTRL	CA	EPM ²	Vitamina D	Vitamina Dia	Vitamina D x Dia
Urina pré-parto						
Creatinina, g/L	0,66	0,69	0,05	0,67	-	-
Urina, L/dia	26,9	28,8	2,64	0,54	-	-
Ca, mg/L	345,0	448,3	38,16	0,03	-	-
Ca, g/dia	8,01	12,83	0,874	0,0002	-	-
Mg, mg/L	66,3	63,9	3,62	0,51	-	-
Mg, g/dia	1,75	1,88	0,182	0,52	-	-
Urina pH	5,69	5,79	0,06	0,25	-	-
Urina pós-parto						
Creatinina, g/L	0,96	0,61	0,289	0,38	0,25	0,33
Urina, L/d	30,5	28,1	2,409	0,41	0,23	0,34
Ca, mg/L	23,8	20,2	4,16	0,50	0,03	0,69
Ca, g/d	0,82	0,58	0,204	0,41	0,06	0,52

Mg, mg/L	63,2	64,2	1,462	0,61	0,84	0,019
Mg, g/dia	1,94	1,85	0,189	0,69	0,77	0,96

¹Tratamentos: CTRL: 3,0 mg/dia de colecalciferol (Rovimix D₃ 500[®], DSM Nutritional Products); e CA: 3,0 mg/dia de calcidiol (Rovimix HyD[®], DSM Nutritional Products).

²EPM = erro-padrão da média.

³Valor de *P*: *P* Trat = efeito da fonte de vitamina D; *P* Dia = efeito do dia da coleta; *P* Trat x Dia = interação entre tratamento e dia de coleta.

Conforme apresentado na Tabela 4, a fonte de vitamina D influenciou o balanço estimado de Ca no pré-parto ($P = 0,003$). Contudo, não houve efeito de tratamento para o balanço de Mg no pré-parto ($P = 0,63$). No pós-parto, a suplementação com calcidiol no pré-parto promoveu balanço negativo de Ca (CTRL = 13,2 vs. CA = -16,3 g/d; $P = 0,001$). Da mesma forma que aconteceu no pré-parto, o balanço de Mg não foi afetado pela fonte de vitamina D no pós-parto ($P = 0,11$).

Tabela 4. Balanço mineral estimado no pré e pós-parto em vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol

Item	CTRL ¹	CA ²	EPM ³	Valor de <i>P</i>
Balanço, g/dia				
Ca pré-parto	24,0	10,9	3,67	0,003
Mg pré-parto	18,7	19,1	1,31	0,63

Ca pós-parto	13,2	-16,3	7,81	0,001
Mg pós-parto	19,5	14,4	2,18	0,11

^{1, 2}Tratamentos: CTRL: 3,0 mg/dia de colecalciferol (Rovimix D₃ 500[®], DSM Nutritional Products); e CA: 3,0 mg/dia de calcidiol (Rovimix HyD[®], DSM Nutritional Products).

³EPM = erro-padrão da média.

Hemograma e Incidência de Doenças Clínicas no Pós-parto

A suplementação com calcidiol aumentou o volume globular no segundo e sétimo dias pós-parto (CTRL = 28,5 vs. CA = 31,8 %; $P = 0,01$; Tabela 5). Porém, nenhum efeito da fonte de vitamina D foi observado para o volume corpuscular médio (**VCM**) ($P = 0,23$), concentração da hemoglobina corpuscular média (**CHCM**) ($P = 0,52$) e leucometria global (Tabela 5). Houve tendência de aumento para a concentração de hemácias no grupo CA ($P = 0,09$). A concentração de hemácias e monócitos foi maior no dia 2 que no dia 7 pós-parto ($P = 0,01$). Não houve efeito de tratamento na concentração de eosinófilos e linfócitos, bem como não houve efeito do dia da coleta ($P > 0,10$). Não houve efeito de dia de coleta ou interação entre a fonte de vitamina D e o dia de coleta para nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 5).

Tabela 5. Perfil hematológico no pós-parto de vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol

Item ¹	Tratamento ¹		EPM ²	Valor de P ³		
	CTRL	CA		Vitamina D	Dia	Vitamina D x Dia
Volume globular, %	28,5	31,8	0,93	0,01	0,36	0,19
VCM, fL [‡]	49,9	51,3	0,79	0,23	0,37	0,81
CHCM, %	31,1	31,8	0,29	0,52	0,42	0,13
Leucometria global, x 10 ³ /μL	14,3	14,0	1,16	0,84	0,58	0,16
Hemácias, x 10 ⁶ /μL	5,8	6,2	0,14	0,09	0,007	0,82
Eosinófilos, x 10 ² /μL	1,537	1,94	0,43	0,52	0,83	0,67
Linfócitos, x 10 ³ /μL	10,1	9,8	0,66	0,65	0,28	0,41
Monócitos, x 10 ³ /μL	0,79	0,81	0,103	0,96	0,008	0,57

¹Tratamentos: CTRL: 3,0 mg/dia de colecalciferol (Rovimix D₃ 500[®], DSM Nutritional Products); e CA: 3,0 mg/dia de calcidiol (Rovimix HyD[®], DSM Nutritional Products).

²EPM = erro-padrão da média.

³Valor de P: P Trat = efeito da fonte de vitamina D; P Dia = efeito do dia da coleta; P Trat x Dia = interação entre tratamento e dia de coleta.

[‡]fL = fentolitro.

Nenhum efeito da fonte de vitamina D foi detectado para retenção de placenta, distocia, metrite e mastite ($P > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Incidência de doenças clínicas em vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol

Item	Incidência, % (n/n)	Tratamento ¹		Valor de <i>P</i>
		CTRL	CA	
Doenças clínicas	Incidência, % (n/n)			
Retenção de placenta	12,5 (5/40)	15,0	15,0	1,00
Distocia	7,5 (3/40)	5,0	10,0	0,55
Metrite	12,5 (5/40)	15,0	25,0	0,43
Mastite	12,5 (5/40)	10,0	10,0	1,00

¹Tratamentos: CTRL: 3,0 mg/dia de colecalciferol (Rovimix D₃ 500[®], DSM Nutritional Products); e CA: 3,0 mg/dia de calcidiol (Rovimix HyD[®], DSM Nutritional Products).

Comportamento ingestivo

As vacas que receberam calcidiol apresentaram menor ruminção apenas no dia do parto, enquanto que as vacas do grupo colecalciferol apresentaram menor ruminção até a segunda semana de lactação ($P = 0,03$; Figura 2A). Assim como ocorreu na ruminção, as vacas do grupo calcidiol apresentaram atividade regular durante a última semana pré-parto e todo o período pós-parto, enquanto que o grupo colecalciferol apresentou redução da atividade da segunda até a quarta semana de lactação ($P = 0,03$; Figura 2B) (Tabela 7).

Calcidiol aumentou o consumo de água (+8,8 L/dia; $P = 0,04$). Houve um menor consumo de água na última semana pré-parto e primeira semana pós-parto ($P < 0,0001$). A taxa de CMS (kg/mim) não foi influenciada pela fonte de vitamina D ($P = 0,59$), contudo, houve efeito da semana na taxa de CMS ($P < 0,0001$). Houve tendência de aumento para taxa de consumo de água (L/mim) no tratamento CA ($P = 0,054$), bem como houve efeito da semana ($P < 0,0001$). Não houve efeito de interação entre a fonte de vitamina D e semana para consumo de água, taxa de CMS ou taxa de consumo de água ($P > 0,10$) (Tabela 7).

Tabela 7. Tempo de ruminção e atividade em vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol

Item *	Tratamento ¹			Valor de P^3		
	CTRL	CA	EPM ²	Vitamina D	Semana	Vitamina D x Semana
Ruminação, mim	532	524	11,2	0,66	<0,0001	0,03
Atividade, mim	457	465	17,8	0,61	0,006	0,03
Água, L/dia	91,3	100,1	2,96	0,04	<0,0001	0,33
CMS, kg/mim	0,17	0,18	0,014	0,59	<0,0001	0,99
Água, L/mim	2,9	3,9	0,37	0,054	<0,0001	0,47

¹Tratamentos: CTRL: 3,0 mg/dia de colecalciferol (Rovimix D₃ 500[®], DSM Nutritional Products); e CA: 3,0 mg/dia de calcidiol (Rovimix HyD[®], DSM Nutritional Products).

²EPM = erro-padrão da média.

³Valor de *P*: *P* Trat = efeito da fonte de vitamina D; *P* Semana = efeito da semana de lactação; *P* Trat x Semana = interação entre tratamento e semana de lactação.

* Valor médio do dia coletados a cada duas horas na última semana de gestação até a sexta semana pós-parto.

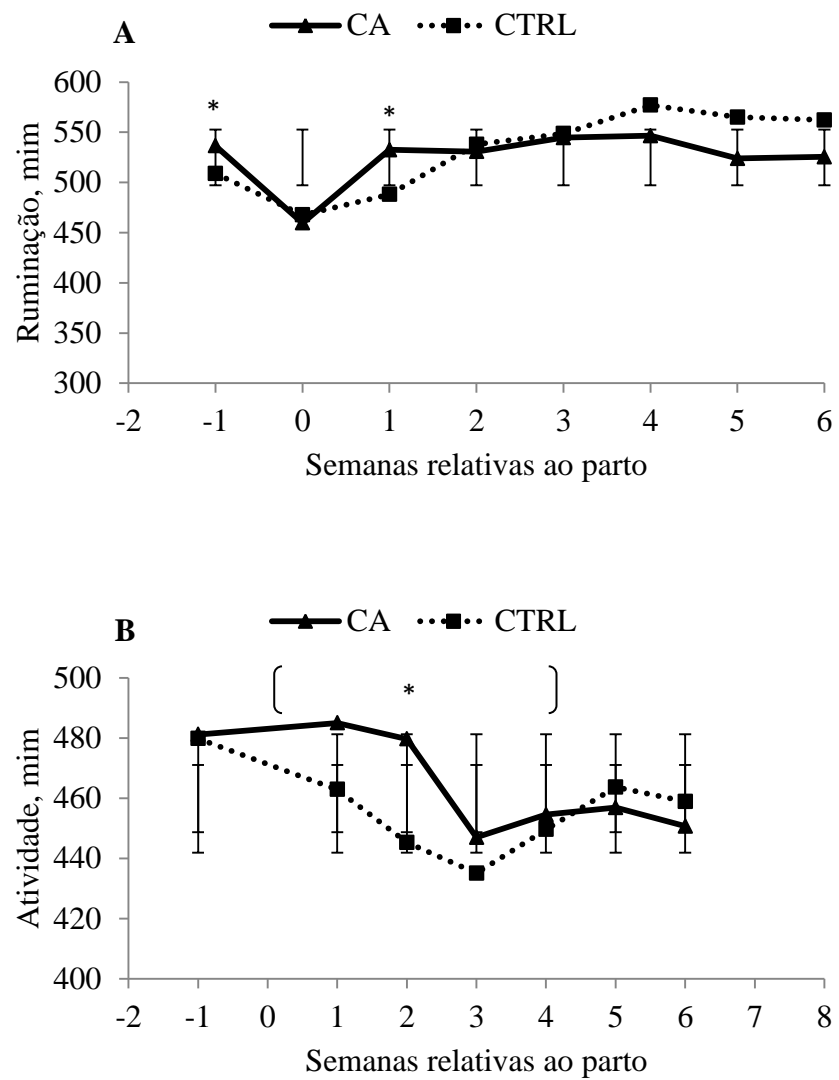


Figura 2. Ruminação (A) e atividade (B) de vacas leiteiras suplementadas com colecalciferol ou calcidiol. * denota efeito de interação entre a fonte de vitamina D e o dia de coleta

CMS no Pré-parto e Balanço de Energia

Houve tendência para aumento do CMS no pré-parto (+1,0 kg/dia; $P = 0,08$) e ingestão calórica para o tratamento calcidiol (+1,6 Mcal/dia; $P = 0,09$) (Tabela 8). A fonte de vitamina D não influenciou o balanço de energia líquida ($P = 0,88$) e o PC ($P = 0,42$). No entanto, maior variação de PC foi observada no tratamento calcidiol (CTRL = $1,02 \pm 0,035$ vs. CA = $1,33 \pm 0,035$ kg/dia; $P < 0,0001$), não sendo observado efeito sobre o ECC ($P = 0,45$) (Tabela 8).

Tabela 8. Consumo de matéria seca (CMS), balanço de energia, peso corporal (PC) e escore de condição corporal (ECC) no pré-parto de vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol

Item	CTRL ¹	CA ²	EPM ³	Valor de P
CMS, kg/dia	10,7	11,7	0,49	0,08
Ingestão calórica, Mcal/dia	17,0	18,6	0,63	0,09
Balanço de energia, Mcal/dia	3,6	3,7	0,68	0,88
PC, kg	679,1	694,5	13,42	0,42
Variação no PC, kg/dia	1,02	1,33	0,035	<0,0001
ECC (escala de 1 a 5)	3,45	3,53	0,08	0,45

^{1, 2}Tratamentos: CTRL: 3,0 mg/dia de colecalciferol (Rovimix D₃ 500[®], DSM Nutritional Products); e CA: 3,0 mg/dia de calcidiol (Rovimix HyD[®], DSM Nutritional Products).

³EPM = erro-padrão da média.

Produção de Colostro e Concentração e Secreção Ca e Mg

As vacas do tratamento CA produziram 2,1 kg/dia a mais de colostro que as do tratamento controle ($P = 0,04$). Não houve efeito de tratamento para as concentrações (g/L) e secreções (g/dia) de Ca e Mg no colostro ($P > 0,05$; Tabela 9).

Tabela 9. Produção de colostro e secreção de Ca e Mg no colostro de vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol

Item	CTRL ¹	CA ²	EPM ³	Valor de <i>P</i>
Colostro, kg/dia	5,4	7,5	0,71	0,04
Cálcio, g/L	3,4	3,3	0,19	0,95
Cálcio, g/dia	19,6	26,3	3,53	0,13
Magnésio, g/L	0,5	0,5	0,03	0,93
Magnésio, g/dia	3,1	4,2	0,56	0,13

^{1, 2}Tratamentos: CTRL: 3,0 mg/dia de colecalciferol (Rovimix D₃ 500[®], DSM Nutritional Products); e CA: 3,0 mg/dia de calcidiol (Rovimix HyD[®], DSM Nutritional Products).

³EPM = erro-padrão da média.

Metabólitos Sanguíneos no Plasma

A suplementação com calcidiol associada a uma dieta acidogênica resultou em maior concentração de glicose no plasma (CTRL = 3,18 vs. CA = 3,63 mM; $P = 0,017$; Tabela 10). Houve efeito de dia de coleta, em que em ambos os tratamentos, a concentração de glicose no

plasma foi maior no dia do parto ($P < 0,0001$; Figura 2A). Houve efeito de interação entre a fonte de vitamina D e o dia de coleta ($P = 0,0036$), onde as vacas do tratamento CA apresentaram maior concentração de glicose apenas no parto (Figura 3A). A concentração de insulina no plasma não foi alterada pela fonte de vitamina D na dieta ($P = 0,44$). Todavia, houve efeito de dia de coleta ($P = 0,004$; Figura 3B), não havendo interação entre a fonte de vitamina D e dia de coleta ($P = 0,52$). As vacas do tratamento CA apresentaram menor concentração plasmática de AGNE (CTRL = $0,43 \pm 0,016$ vs. CA = $0,32 \pm 0,016$ mmol/L; $P < 0,0001$). Independente do tratamento, a concentração de AGNE foi maior no dia do parto ($P < 0,0001$; Figura 3C). Houve interação entre fonte de vitamina D e dia de coleta ($P < 0,0001$), sendo que as vacas do tratamento CA apresentaram maior concentração plasmática de AGNE no dia do parto, enquanto que as vacas do tratamento CTRL mantiveram concentração mais elevada de AGNE até o sétimo dia pós-parto (Figura 3C). A fonte de vitamina D não influenciou a concentração de BHB no plasma ($P = 0,36$). Da mesma maneira, não houve efeito no dia de coleta ($P = 0,10$; Figura 3D), nem houve interação entre os fatores ($P = 0,76$) (Tabela 10).

Tabela 10. Concentração plasmática de glicose, insulina, ácidos graxos não esterificados (AGNE) e β -hidroxibutirato (BHB) no plasma de vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol

Item	Tratamento ¹		EPM ²	Valor de P ³		
	CTRL	CA		Vitamina D	Dia	Vitamina D x Dia
	Glicose, mmol/L	3,18	3,63	1,68	0,0017	<0,0001
Insulina, ng/mL	0,37	0,34	0,031	0,44	0,004	0,52
AGNE, mmol/L	0,43	0,32	0,016	<0,0001	<0,0001	<0,0001
BHB, mmol/L	0,72	0,70	0,022	0,36	0,10	0,76

¹Tratamentos: CTRL: 3,0 mg/dia de colecalciferol (Rovimix D₃ 500[®], DSM Nutritional Products); e CA: 3,0 mg/dia de calcidiol (Rovimix HyD[®], DSM Nutritional Products).

²EPM = erro-padrão da média.

³Valor de P: P Trat = efeito da fonte de vitamina D; P Dia = efeito do dia da coleta; P Trat x Dia = interação entre tratamento e dia de coleta.

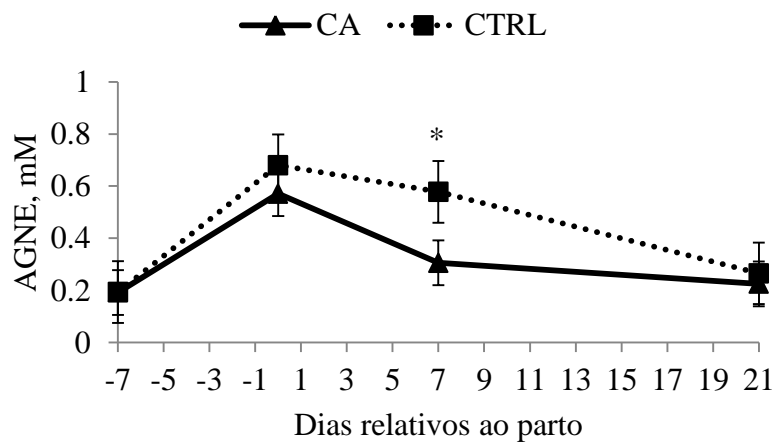
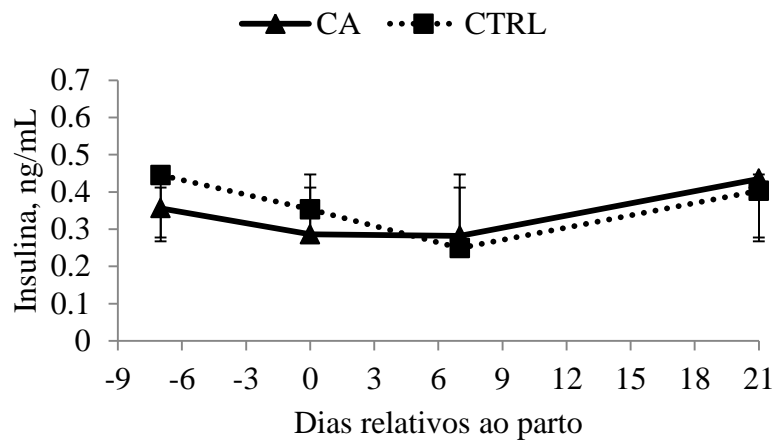
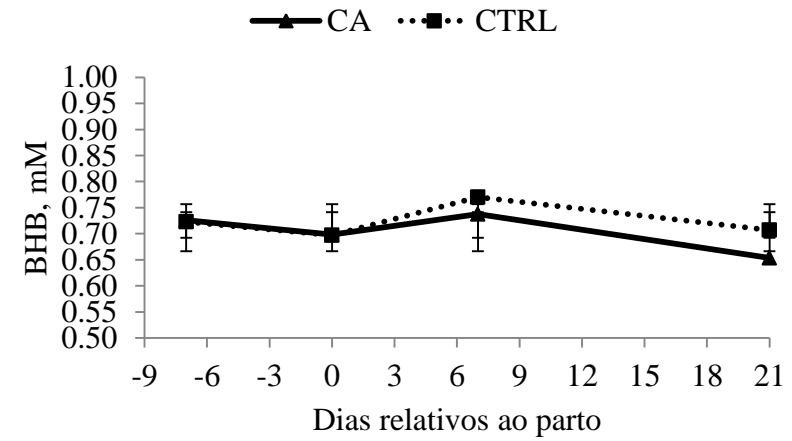
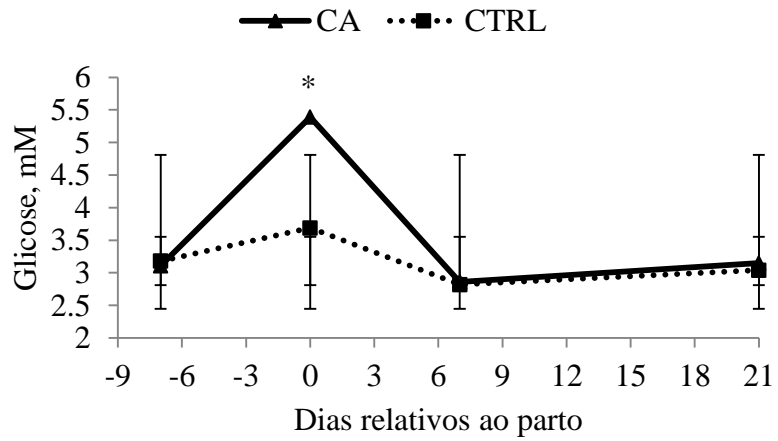


Figura 3. Concentração de glicose (A), insulina (B), ácidos graxos não esterificados - AGNE (C) e β -hidroxibutirato - BHB (D) de vacas leiteiras suplementadas com colecalciferol ou calcidiol. * denota efeito de interação entre a fonte de vitamina D e o dia de coleta.

Produção e Composição do Leite

Foram observadas maiores produções de leite ($P = 0,03$), de 3,5%LCG ($P = 0,03$) e de LCE ($P = 0,03$) (Tabela 11) para o tratamento calcidiol. Efeito de semana de lactação também foi observado para produção de leite (Figura 4A), 3,5%LCG (Figura 4B) e LCE (Figura 4C) ($P < 0,01$). Não houve interação para produção de leite, 3,5%LCG ou LCE ($P > 0,05$; Tabela 5). Houve tendência de efeito de tratamento para produção de gordura ($P = 0,054$) e as vacas do grupo calcidiol produziram mais proteína e lactose ($P = 0,04$) (Tabela 11). De forma similar ao que ocorreu com a produção de leite, as produções de gordura, proteína e lactose foram influenciadas pela semana de lactação ($P = 0,01$; Tabela 11). Não houve efeito de tratamento sobre os teores de gordura, proteína, lactose e ureia ($P > 0,05$) (Tabela 11).

Tabela 11. Produção de leite (PL), produção de leite corrigida para gordura (3,5%LCG) e energia (LCE) e composição do leite de vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol

Item	Tratamento ¹		EPM ²	Valor de P^3		
	CTRL	CA		Vitamina D	Semana	Vitamina D x Semana
PL, kg/dia	29,71	32,47	0,89	0,03	<0,01	0,57
3,5%LCG, kg/dia	29,09	33,87	0,99	0,03	<0,01	0,49
LCE, kg/d	29,33	32,42	0,92	0,03	<0,01	0,49
Gordura, kg/dia	1,05	1,17	0,04	0,054	<0,01	0,62
Proteína, kg/dia	0,88	0,96	0,03	0,04	<0,01	0,50
Lactose, kg/dia	1,36	1,49	0,04	0,04	<0,01	0,62
Gordura, %	3,56	3,59	0,14	0,84	-	-
Proteína, %	2,96	2,98	0,04	0,82	-	-
Lactose, %	4,58	4,59	0,03	0,78	-	-

Ureia, mg/dL	16,72	16,46	0,77	0,80	-	-
--------------	-------	-------	------	------	---	---

¹Tratamentos: CTRL: 3,0 mg/dia de colecalciferol (Rovimix D₃ 500[®], DSM Nutritional Products); e CA: 3,0 mg/dia de calcidiol (Rovimix HyD[®], DSM Nutritional Products).

²EPM = erro-padrão da média.

⁴Valor de *P*: *P* Tratamento = efeito da fonte de vitamina D; *P* Semana = efeito da semana; *P* vitamina D x Semana = interação entre tratamento e tempo.

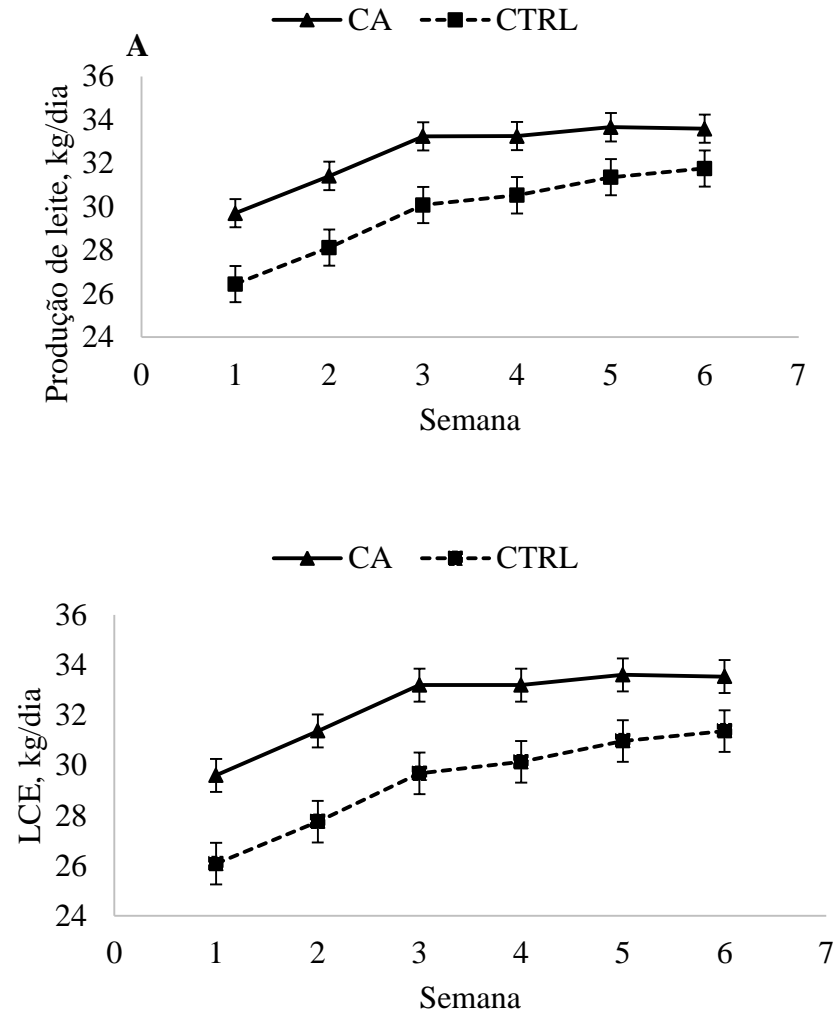


Figura 4. Produção de leite (A) e de leite corrigido para gordura - 3,5%LCG (B) e energia - LCE (C) de vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol. Painel A: média de produção (kg/dia): CTRL = $29,7 \pm 0,86$; CA = $32,5 \pm 0,88$. Painel B: média de produção (kg/dia): CTRL = $29,9 \pm 0,99$; CA = $33,1 \pm 1,01$. Painel C: média de produção (kg/dia): CTRL = $29,3 \pm 0,94$; CA = $32,4 \pm 0,92$.

CMS e Balanço de Energia Pós-parto

Assim como no período pré-parto, não houve efeito da fonte de vitamina D sobre o CMS no pós-parto ($P = 0,31$; Tabela 12). Houve efeito da semana de lactação sobre o CMS, sendo observado menor CMS no início da lactação ($P < 0,0001$). Houve significância marginal para maior energia secretada no leite para o grupo calcidiol ($P = 0,07$). Houve efeito de semana de lactação ($P < 0,0001$) (Tabela 12). Não houve efeito de tratamento sobre a ingestão calórica (CTRL = 29,4 vs. CA = 29,1 Mcal/dia; $P = 0,76$), que foi influenciada pela semana de lactação ($P < 0,0001$). As vacas suplementadas com calcidiol apresentaram menor energia no leite apenas na primeira semana de lactação, enquanto que o grupo controle apresentou menor energia no leite até a terceira semana de lactação ($P = 0,09$). Houve tendência de aumento no balanço de energia negativo para o grupo calcidiol (CTRL = - 0,3 vs. CA = - 2,3 Mcal/dia; $P = 0,08$) e, conforme esperado, o balanço negativo de energia foi maior no início da lactação ($P < 0,0001$). A variação no PC não foi influenciada pela fonte de vitamina D ($P = 0,15$). Contudo, no início da lactação essa variação no peso foi mais pronunciada ($P < 0,001$). O ECC não foi afetado pelos tratamentos ($P = 0,38$), mas aumentou com o avanço da lactação ($P < 0,0001$). Não houve interação entre a fonte de vitamina D e a semana de lactação para CMS ($P = 0,34$), energia secretada no leite ($P = 0,49$), PC ($P = 0,41$), variação no PC ($P = 0,26$), e ECC ($P = 0,26$) (Tabela 12).

Tabela 12. Consumo de matéria seca (CMS), ingestão calórica, balanço de energia líquido (BEL), peso corporal (PC), variação do peso corporal e escore de condição corporal (ECC) no pós-parto de vacas da raça Holandês, recebendo dieta acidogênica nos últimos 21 dias pré-parto, suplementada com colecalciferol ou calcidiol

Item ¹	Tratamento ²		EPM ²	Valor de P ³		
	CTRL	CA		Vitamina D	Semana	Vitamina D x Semana
CMS, kg/dia	20,2	19,4	0,51	0,31	< 0,0001	0,34
Energia retida no leite, Mcal/dia	19,9	21,7	0,68	0,07	< 0,0001	0,49
Ingestão calórica, Mcal/dia	29,4	29,1	0,74	0,76	< 0,0001	0,08
BEL, Mcal/dia	-0,3	-2,3	0,73	0,07	< 0,0001	0,09
PC, kg	597,1	600,1	12,92	0,87	< 0,0001	0,41
Variação no PC, kg/dia	-1,0	-1,3	0,25	0,15	< 0,0001	0,26
ECC (escala de 1 a 5)	3,1	2,9	0,102	0,38	0,0025	0,26

¹Tratamentos: CTRL: 3,0 mg/dia de colecalciferol (Rovimix D₃ 500[®], DSM Nutritional Products); e CA: 3,0 mg/dia de calcidiol (Rovimix HyD[®], DSM Nutritional Products).

²EPM = erro-padrão da média.

³ Valor de P: P Trat = efeito da fonte de vitamina D; P semana = efeito da semana de lactação; P vitamina D x Semana = interação entre tratamento e a semana de lactação.

Correlações de Pearson

Houve correlação positiva entre Ca e Mg excretados na urina, tMg e iCa, Ca e Mg no colostro, Mg secretado no colostro e a concentração de 25-OH-D₃ no plasma, bem como o balanço de Ca e o balanço de Mg e a concentração de glicose e 25-OH-D₃ no plasma. Correlação negativa foi observada para o balanço de Ca e o Ca excretado na urina, o balanço de Ca e o Ca secretado no colostro, o balanço de Ca e a concentração de 25-OH-D₃ e a concentração de BHB no plasma e a produção de leite (Tabela 13).

Tabela 13. Coeficientes de correlação de Pearson para as concentrações de iCa, tCa, tMg, Mg e Ca secretado no colostro, Ca (uCa) e Mg (uMg) na urina, 25-OH-D₃, balanço de Ca e Mg, glicose, BHB e produção de leite

Item		Correlação de Pearson	Valor de <i>P</i>
uCa	uMg	0,49	0,0015
tMg	iCa	0,32	0,048
tCa	iCa	0,66	<0,0001
Ca colostro	Mg colostro	0,99	<0,0001
Mg colostro	25-OH-D ₃	0,37	0,037
Balanço de Ca	uCa	-0,44	0,004
Balanço de Ca	Balanço de Mg	0,85	<0,0001
Balanço de Ca	Ca colostro	-0,35	0,028
Balanço de Ca	25-OH-D ₃	-0,37	0,01
Glicose	25-OH-D ₃	0,35	0,036
BHB	Produção de leite	-0,33	0,041

DISCUSSÃO

Metabolismo do Ca e a Vitamina D

A hipótese do presente estudo era de que a suplementação de calcidiol em substituição ao colecalciferol poderia aumentar a concentração de Ca no sangue e, conseqüentemente, aumentar a excreção urinária de Ca devido à melhora da integração do metabolismo de Ca.

A rota metabólica para aumento da concentração de Ca no sangue é mediada por dois metabólitos, o PTH e a forma ativa da vitamina D. Quando há redução na concentração de Ca no sangue, a secreção de PTH é estimulada, favorecendo a síntese de 1,25-dihidroxitamina D₃. O calcidiol é o primeiro metabólito na transformação da vitamina D₃ no hormônio fisiologicamente ativo (Celi et al., 2018). A ativação da vitamina D₃ é controlada pela hidroxilação do C₂₅ no fígado formando o metabólito 25-hidroxicolecalciferol (Horst et al., 1994). No presente estudo, a 25-OH-D₃ já está na forma ativa no tratamento calcidiol e apresenta longa meia vida (15 dias) se comparada com o colecalciferol (Jones, 2008).

Os valores para diagnóstico de hipocalcemia subclínica é de iCa < 1,0 mM (Oetzel et al., 1988); tCa < 2,0 mM (Reinhardt et al., 2011) ou tCa < 2,15 mM (Martinez et al., 2012), portanto, constatou-se que os animais de ambos os tratamentos estavam normocalcêmicos no presente estudo. Isto pode ser a razão da falta de efeito de tratamento na concentração de PTH no plasma, pois o PTH é o principal hormônio calcicotrófico que sinaliza os mecanismos reguladores de Ca no sangue quando a concentração de Ca está abaixo do normal (Hernández-Castellano et al., 2019).

Quando a concentração de Ca é reduzida (< 2,5 mM), a glândula da paratireóide estimula a secreção de PTH (Goff et al., 2014). Outro motivo para manutenção dos níveis normais de Ca é que a concentração sérica média de Mg estava acima de 2,2 mg/dL. A

concentração acima de 1,9 mg/dL sugere que a responsividade dos tecidos ao PTH não foi suprimida (Rude e Gruber, 2004).

Houve tendência de aumento no iCa para as vacas suplementadas com calcidiol (+0,07 mM) no pós-parto. Por outro lado, Rodney et al. (2018a) observaram aumento da concentração sérica de iCa no pré-parto, mas não no pós-parto em vacas recebendo dieta acidogênica (-126,6 mEq/kg de MS) suplementadas com 3,0 mg/dia de calcidiol. Apesar de ter ocorrido apenas tendência de aumento para o Ca no sangue, os dados de excreção de Ca na urina sugerem que este aumento foi suficiente para melhorar os mecanismos homeostáticos de regulação do Ca. Assim como ocorreu no presente estudo, a excreção urinária de Ca aumentou 4,1 g/dia nas vacas suplementadas com calcidiol (Oehlschlaeger et al., 2014). Ademais, o aumento da concentração de Ca no sangue provocado pela suplementação com calcidiol associada a uma dieta acidogênica foi a mesma (+0,07 mM) nos estudos de Rodney et al. (2018a) e Poindexter et al. (2020).

A concentração de Ca no sangue é rigidamente regulada e aumentos na concentração de Ca resultam em hipercalciúria (Constable et al., 2019), com consequente maior excreção urinária de Ca. De maneira oposta, quando a concentração de Ca reduz, a reabsorção renal aumenta na tentativa de manter os níveis normais de Ca (Blaine et al., 2014). Os resultados do presente estudo sugerem uma menor ativação dos sítios de reabsorção nos túbulos renais devido à maior concentração de Ca no sangue (Blaine et al., 2014).

O calcitriol (1,25-dihydroxyvitamina-D₃) estimula o transporte de Ca através da membrana pelo aumento da expressão luminal dos canais de Ca, principalmente o receptor transitório potencial vanilóide tipo 5 e 6 (TRPV5;6) (Hoenderop, 2005). Este aumento no fluxo de Ca através da membrana promove redução da reabsorção renal (Fredeen et al., 1988). As vacas suplementadas com calcidiol apresentaram aumento de 268% de 25-OH-D₃ no plasma. Isto, provavelmente, resultou em maior absorção intestinal de Ca, conforme reportado

por Oehlschlaeger et al. (2014). A absorção intestinal de Ca é mediada por transporte transcelular através da entrada de Ca em sítios específicos presentes na superfície tipo borda em escova no lúmen intestinal e finalmente o transporte intracelular é mediado pela proteína ligada ao Ca e calbindina- D_{9k} (Lieben et al., 2011) sendo o calcitriol o principal hormônio responsável pelo aumento da absorção intestinal de Ca.

Além disso, a suplementação na dieta com colecalciferol (CTRL) promoveu concentração média de 66,6 ng/mL de 25-OH- D_3 durante todo o período experimental, sugerindo limitação da conversão de colecalciferol em calcidiol (Poindexter et al., 2020; Rodney et al. 2018a). Fisiologicamente, quando a concentração de minerais no sangue no sangue aumenta acima dos níveis normais, a excreção urinária é aumentada com o intuito de manter os níveis fisiológicos normais. Portanto, a falta de efeito da suplementação com calcidiol na excreção de Mg na urina no pré e pós-parto foi resultado da similaridade na concentração de Mg no sangue em ambos os tratamentos. Contrário ao que foi observado no presente estudo, Rodney et al. (2018a) reportaram a redução da concentração de Mg no sangue, resultou em menor excreção urinária de Mg nas vacas recebendo calcidiol 21 dias antes do parto, associada à dieta acidogênica (DCAD = - 126,6 mEq/kg de MS).

Não houve efeito da fonte de vitamina D na concentração de tP (média = 2,2 mM). Isto é importante, pois a concentração de P no sangue está diretamente relacionada com a ingestão de P da dieta (Horst, 1986). As dietas pré-parto apresentaram concentração de 0,27% de P no presente estudo. Além disso, alta concentração de P no sangue reduz a conversão de calcidiol em calcitriol pelo impedimento da hidroxilação mediada pela enzima 1- α hidroxilase (Anderson et al., 2017).

Em razão da maior excreção de Ca na urina nas vacas que receberam calcidiol, o balanço positivo de Ca no pré-parto foi menor e, como resultado, o balanço foi negativo no pós-parto. Além disso, as vacas do tratamento calcidiol produziram 2,5 kg/dia a mais de

colostro, resultando na secreção de 6,6 g/d a mais de Ca no colostro. Apesar da secreção de Ca não ter sido estatisticamente diferente, isto impactou o balanço pós-parto de Ca, como demonstrado pela correlação negativa entre o balanço de Ca e o Ca excretado na urina ($r = -0,44$) e o balanço de Ca e a secreção de Ca no colostro ($r = -0,35$).

Da mesma forma, Rodney et al. (2018a) observaram valores similares, embora o balanço negativo tenha sido menor, provavelmente devido à fonte de vitamina D não ter influenciado produção de colostro neste estudo. No presente estudo, o balanço de Mg não foi influenciado pela fonte de vitamina D, o que pode ser explicado pela não influência da fonte de vitamina D na excreção de Mg na urina e no colostro. Contudo, Rodney et al. (2018a) reportaram aumento do balanço negativo de Mg nas vacas suplementadas com calcidiol.

Perfil hematológico e Incidência de Doenças no Pós-parto

Vacas de alta produção de leite no período de transição experimentam desequilíbrio na homeostase fisiológica que resulta em excessiva mobilização de reservas, impedimento da função imune e estresse oxidativo (Abuelo et al., 2015). A suplementação com calcidiol 21 dias antes do parto não reduziu a incidência de doenças. A vitamina D é essencial para ativação do sistema imune (Nelson et al., 2012) sendo um regulador importante, suprimindo a proliferação dos linfócitos e interferon- γ (Nelson et al., 2011). A resposta imune mediada pela vitamina D depende da concentração de 25-OH-D₃ no plasma (Nelson et al., 2011). Dessa forma, era esperado que a resposta às doenças pudesse ser melhorada devido à maior concentração de 25-OH-D₃.

A falta de efeito do calcidiol na incidência de doenças pode estar relacionada ao fato de que todas as vacas do estudo estavam normocalcêmicas e a ocorrência das doenças foi baixa, o que possivelmente impossibilitou a detecção de efeito estatístico. É bem conhecido que animais hipocalcêmicos são mais susceptíveis às doenças no período pós-parto (Martinez

et al., 2012; Rodríguez et al., 2017). Além disso, o *n* experimental não permite fazer uma avaliação correta da prevalência de doenças no presente estudo.

Ademais, as vacas que apresentaram alguma doença no pós-parto não apresentaram menor concentração de Ca no pré ou pós-parto (dados não mostrados). Contudo, Martinez et al. (2018b) observaram redução da incidência de retenção de placenta (46,2 vs. 23,1%) e metrite (30,8 vs. 2,5%) nas vacas suplementadas com calcidiol em dieta acidogênica. Nesse estudo (n = 80 vacas distribuídas em quatro tratamentos), a prevalência global de retenção de placenta e metrite foram de 16,5 e 34,6%, respectivamente. Vacas suplementadas com 3,0 mg/dia de colecalciferol ou calcidiol foram submetidas a um desafio infeccioso com *S. uberis* e os autores observaram redução da severidade da mastite nas vacas suplementadas com calcidiol (Poindexter et al., 2020). Martinez et al. (2018b) observaram maior capacidade fagocitária dos leucócitos e aumento dos neutrófilos com queima oxidativa nas vacas suplementadas com calcidiol, mostrando um aumento da resposta imune nestes animais.

No presente estudo, o calcidiol aumentou o volume globular (28,5 vs. 31,8%). Isto pode estar relacionado com maior necessidade por oxigênio, possivelmente devido à maior produção de leite nos animais do grupo calcidiol. Oliveira et al. (2019) observaram aumento do volume globular em vacas Nelore no pós-parto imediato. Contudo, para elucidar os efeitos do calcidiol no sistema imune, a capacidade oxidativa e fagocitária dos leucócitos deveria ser avaliada, como mostrado por Martinez et al. (2018b), que observaram aumento da capacidade oxidativa dos neutrófilos em vacas recebendo calcidiol através da mensuração de células com atividade fagocitária desafiadas *in vitro* com *Escherichia coli*.

Ruminação, Atividade e Comportamento Ingestivo

Diversos estudos demonstraram o impacto da proximidade do parto na ruminação (Calamari et al., 2014; Kaufman et al., 2016; Goff et al., 2014) em resposta às mudanças fisiológicas e metabólicas relacionadas com a redução na concentração de Ca no sangue (Goff

et al., 2020) e drástica redução no CMS (Liboreiro et al., 2015). No presente estudo, ambos os tratamentos tiveram grande decréscimo no CMS como descrito por outros estudos. No entanto, as vacas do grupo calcidiol apresentaram pouca variação no tempo de ruminação durante todo o período experimental, com menor ruminação apenas no dia do parto. Por outro lado, as vacas suplementadas com colecalciferol apresentaram menor ruminação até a segunda semana de lactação. Cada hora de aumento na ruminação diária representa aumento de 1,26 kg/dia na produção de leite (Johnston e DeVries, 2018).

Além disso, a ruminação está intimamente relacionada à motilidade ruminal, controlada também pela disponibilidade de Ca no sangue e essa motilidade impacta diretamente o CMS (Jørgensen et al., 1998). As contrações ruminais cessam quando a concentração de Ca ionizado são menores que 0,6 mM (Jørgensen et al., 1998). Ademais existe direta correlação entre a concentração de Ca e a ruminação ($r = 0,75$; $P = 0,01$) quando a concentração plasmática de Ca é menor que 1,0 mM (Goff et al., 2020). O grupo CA apresentou maior atividade na última semana pré-parto e nas primeiras quatro semanas pós parto. Ademais, no presente estudo, a produção de leite correlacionou-se positivamente com a atividade ($r = 0,17$; $P = 0,008$).

A taxas de CMS (gMS/mim) e água (L/mim) não foram influenciadas pela fonte de vitamina D. Contudo, as vacas do grupo CA consumiram mais água (+8,8 L/dia), possivelmente relacionado com a maior produção de leite. Cardot et al. (2004) observaram que para cada kg de leite a mais, as vacas consomem cerca de 1,33 L/dia adicionais de água. No presente estudo, esse consumo adicional foi 3,14 L/dia, possivelmente relacionado com a maior temperatura nos trópicos.

Metabólitos no Plasma, CMS, Balanço de Energia e Produção de Leite

A segunda hipótese do presente estudo era de que a suplementação com calcidiol poderia melhorar os mecanismos homeostáticos do Ca, promover diminuição do *status*

energético negativo e aumentar o desempenho produtivo de vacas leiteiras através da integração entre o calcidiol e o metabolismo energético (Rodney et al., 2018a). Em resumo, os resultados da suplementação com calcidiol foram: aumento da concentração de glicose, redução da concentração de ácidos graxos não esterificados e aumento das produções de leite (+ 2,8 kg/dia), LCE (+ 4,8 kg/dia) e LCG (+ 3,1 kg/dia). Portanto, a hipótese do presente estudo não foi rejeitada.

O CMS médio no presente estudo foi semelhante ao reportado por Santos et al. (2019), que observaram CMS de 11,2 kg/dia em vacas multíparas da raça Holandês com peso, ECC e produção de leite, respectivamente de, 715 kg, 3,57 e 36,7 kg/dia recebendo dieta acidogênica. A tendência de aumento de CMS no pré-parto para as vacas do tratamento CA (+1,0 kg/dia) foi uma surpresa no presente estudo, pois as duas dietas eram semelhantes, como observado por Martinez et al. (2018a) que testaram a suplementação com colecalciferol ou calcidiol e não observaram diferença no CMS. No entanto, como demonstrado por Johnston e DeVries (2018), o CMS está associado ao tempo de ruminação em vacas leiteiras. No presente estudo, o tempo de ruminação do grupo calcidiol foi maior (+28 min) no pré-parto que o grupo controle, possivelmente influenciando o CMS no pré-parto.

O exato mecanismo envolvido nessa redução do CMS em vacas recebendo dieta acidogênica no pré-parto não está completamente entendido, mas a acidose metabólica causada por essas dietas pode ser umas das razões para essa redução (Zimpel et al., 2018).

A suplementação com calcidiol na dieta não influenciou o balanço de energia no pré-parto, o que pode ser explicado pelo CMS e de energia semelhante nos dois tratamentos. Martinez et al. (2018a) não encontraram diferença no balanço de energia de vacas recebendo colecalciferol ou calcidiol 21 dias antes do parto. No presente estudo, as vacas que receberam calcidiol apresentaram variação positiva no peso corporal, em parte relacionada com o peso superior dos bezerros ao nascimento (+ 5,6 kg; $P = 0,013$). A mesma resposta não foi

observada por Martinez et al. (2018a) quanto ao efeito da fonte de vitamina D sobre a variação de peso das vacas no pré-parto.

No dia do parto, a vaca necessita de mais energia para produção do colostro, e, nessa condição, maior quantidade de nutrientes são direcionados para a glândula mamária, já que o organismo da vaca necessita de mais nutrientes (glicose, proteína, Ca, etc.). Sendo assim, o aumento na produção de colostro (+2,1 kg/vaca) no tratamento calcidiol, possivelmente ocorreu devido à maior concentração de glicose no plasma.

A glicose é um dos principais substratos para formação da lactose (Cant et al., 2002) e, conseqüentemente, um dos principais responsáveis para produção de leite (Danes et al., 2020). Embora tenha sido observada apenas uma tendência de aumento no consumo no pré-parto (+1,0 kg/dia), pode ser uma das razões para o aumento da glicose no plasma das vacas do tratamento calcidiol no dia do parto e, como consequência disso, as vacas que receberam calcidiol apresentaram maior produção de colostro. Devido ao aumento na produção de colostro, poderia-se esperar maior secreção de Ca, fato que não ocorreu, mostrando que o calcidiol foi capaz de manter a homeostase do Ca, suprimindo as necessidades de Ca para maior produção de colostro. De forma distinta ao presente estudo, o calcidiol aumentou a secreção de Ca no colostro em vacas recebendo dieta acidogênica 21 dias antes do parto (Rodney et al., 2018a).

Grande quantidade de glicose é requerida para uma variedade de funções e mecanismos fisiológicos como o sistema imune, o metabolismo energético, a produção de leite e a reprodução. O requerimento diário de glicose é 2,7 vezes maior em vacas no início da lactação (Sundrum, 2015). No presente estudo, a suplementação com calcidiol aumentou em 0,45 mmol/L a concentração de glicose no plasma, na prática, isto significa mais glicose disponível para atendimento das necessidades da vaca. No início da lactação as vacas leiteiras em resposta às mudanças metabólicas e fisiológicas podem apresentar resistência à insulina

(Dekoster e Opsomer, 2013; Mair et al., 2016) e a baixa concentração de insulina no plasma (Gärtner et al., 2019), uma vez que a insulina é o principal metabólito que sinaliza para que ocorra a absorção de glicose. Contudo, no presente estudo, a concentração de insulina não foi influenciada pela fonte de vitamina D. Da mesma forma, Martinez et al. (2018a) não observaram efeito da suplementação com calcidiol na concentração plasmática de insulina.

A ocorrência de lipólise é comum em vacas no início da lactação devido à grande demanda energética nesse período (Contreras e Sordillo, 2011) e essa mobilização de reservas está intimamente associada com o decréscimo do CMS no pós-parto e a diminuição da capacidade fagocítica do sistema imune (Martinez et al., 2014). Como esperado, há incremento na concentração plasmática de AGNE com o aumento da demanda energética após o parto, acompanhada de diminuição no CMS. Então, para compensar o desequilíbrio entre demanda e energia disponível, a vaca mobiliza gordura do próprio organismo (Contreras e Sordillo, 2011). A suplementação com calcidiol reduziu a concentração de AGNE no plasma.

A menor concentração de AGNE no plasma das vacas recebendo calcidiol pode ser devido a menor resistência dos tecidos alvos à insulina, um hormônio antilipolítico. Provavelmente, as vacas do grupo controle experimentaram algum grau de resistência à insulina no início da lactação, assim como observado por Rico et al. (2015) em vacas multíparas prenhes, não lactantes com AGNE acima de 0,4 mM. No presente estudo, a concentração média de AGNE no grupo controle foi de 0,43 mM, apresentando 0,68 e 0,58 mM no dia do parto de sete dias pós-parto, respectivamente. De forma semelhante ao diabetes tipo 2, a secreção de insulina não é comprometida pelas células β no pâncreas, contudo, a entrada de glicose nos tecidos alvos é afetada e ocorre uma maior necessidade de mobilização de reservas corporais para oxidação no fígado e produção de energia na vaca leiteira.

Não houve efeito da fonte de vitamina D na concentração de insulina, contudo, a resistência à insulina pode ocorrer em tecidos alvos específicos (Dekoster e Opsomer, 2013) e a maior lipólise no grupo suplementado com colecalciferol suporta essa hipótese no presente estudo. Ademais, maior concentração de glicose no plasma inibe a atividade da carnitina palmitoil transferase 1 (**CPT1**), diminuindo assim a oxidação de ácidos graxos (Schäff et al., 2013), como ocorreu nas vacas suplementadas com calcidiol.

O BHB não foi influenciado pela fonte de vitamina D, e o mesmo foi reportado por Martinez et al. (2018a). Essa resposta pode ser decorrente ao fato do fígado não ter excedido sua capacidade em oxidar os ácidos graxos livres. A concentração normal de BHB no plasma é menor que 1,2 mM; quando essa concentração excede 1,2 a 1,5 mM, a vaca pode apresentar cetose subclínica ou clínica (Iwersen et al., 2013). No presente estudo, as vacas recebendo colecalciferol ou calcidiol apresentaram concentração de BHB de 0,72 e 0,70 mM, respectivamente. Curiosamente, a produção de leite foi inversamente relacionada com a concentração de BHB no plasma ($r = -0,33$; $P = 0,041$) no presente estudo.

O grupo calcidiol produziu 2,8 kg/leite/dia a mais em relação ao controle. Durante a lactação grande parte da glicose disponível (50 a 85%) é direcionada para a produção de leite na glândula mamária (Duhlmeier et al., 2005; Zhao e Keating, 2007). Danes et al. (2020) observaram aumento de 6,4 kg/dia de leite em vacas recebendo infusão abomasal de 3,1 Mcal/dia de glicose. A suplementação com calcidiol promoveu aumento na concentração de glicose no plasma no presente estudo. A maior parte da glicose circulante em ruminantes tem origem hepática e renal, por meio da gliconeogênese, sendo a glicose absorvida por duas vias: o transporte facilitado e o cotransporte. O transporte facilitado é mediado principalmente por transportadores de glicose (**GLUT4**) estimulados pela secreção de insulina (DeKoster e Opsomer, 2013) e **GLUT1** para a glândula mamária que não depende da sinalização pela insulina. Os resultados do presente estudo sugerem que maior concentração de glicose foi

direcionada para a glândula mamária e que os animais do grupo CA apresentaram menor expressão de genes relacionados à síntese de carnitina (Schlegel et al., 2011).

No presente estudo, a concentração plasmática de insulina não foi influenciada pela fonte de vitamina D. Similarmente, a fonte de vitamina D não influenciou a concentração de insulina em vacas recebendo colecalciferol ou calcidiol associado à dieta acidogênica (-126,6 mEq/kg de MS) (Martinez et al., 2018a; Rodney et al., 2018b). Os autores atribuíram a maior produção de leite para as vacas que receberam calcidiol à diminuição da morbidade, com redução de 91,8% na incidência de retenção de placenta e 44% de metrite (Martinez et al., 2018b). No presente estudo, parcialmente a maior produção de leite no grupo CA pode estar relacionado com o maior CMS no pré-parto e conseqüentemente maior energia e possivelmente mais substratos disponíveis para oxidação no fígado e maior produção de glicose. Ademais, a concentração de 25-OH-D₃ apresentou correlação positiva com a concentração de glicose no plasma ($r = 0,35$; $P = 0,036$). Outra explicação para a maior produção de leite no grupo CA é o maior consumo de MS no pré-parto, resultando em maior consumo de energia neste tratamento com alta correlação positiva ($r = 0,98$; $P < 0,0001$). Gruber et al. (2013) observaram maior peso e produção de leite (+ 4,1 kg/dia) em vacas recebendo dietas com maior concentração de energia durante 18 dias até o parto.

Outra possível explicação para o aumento da produção de leite no tratamento calcidiol no presente estudo é que existe relação positiva entre o 25-OH-D₃ e o fator de crescimento semelhante à insulina (**IGF-1**), e o IGF-1 e a glicose (Rodney et al., 2018b). O IGF-1 é um hormônio de crescimento e diferenciação celular, que estimula a proliferação celular na glândula mamária (McGrath et al., 1991). Contudo, os mecanismos dessa relação entre a 25-OH-D₃ e o IGF-1 são desconhecidos. Lee et al. (2007) demonstraram em estudo com ratos haver uma regulação endócrina do metabolismo energético.

A osteocalcina produzida pelos osteoblastos maduros aumenta a proliferação de células β , a secreção de insulina e a sensibilidade dos tecidos à insulina (Lee et al., 2007) criando um feedback negativo entre o metabolismo ósseo e o energético. Rodney et al. (2018b) demonstraram que existem fortes evidências dessa relação também em vacas leiteiras e que essa interação parece promover prolongada resposta na produção de leite. Em síntese, os resultados do presente estudo sugerem que a melhora do metabolismo mineral promoveu redução dos AGNE e consequente melhora no metabolismo energético.

A fonte de vitamina D não influenciou o CMS, peso corporal e variação no peso e ECC no pós-parto. Houve efeito da semana de lactação na energia secretada no leite e no balanço energético. Isto, possivelmente, ocorreu devido à adaptação das vacas à nova dieta pós-parto, que favorece a multiplicação de microrganismos utilizadores de CNF e crescimento daqueles produtores de ácido láctico (Block, 2010), o que pode explicar a redução na concentração de gordura até a segunda semana de lactação. Adicionalmente, as vacas no início da lactação apresentaram menor CMS, impactando a ingestão de energia observada nas semanas iniciais de lactação. A ausência de efeito da fonte de vitamina D no balanço energético pós-parto pode ser explicada pela semelhante ingestão de MS, considerando que todas as vacas receberam a mesma dieta de lactação no pós-parto.

O calcidiol aumentou a energia secretada no leite (+1,8 Mcal/dia), relacionado à maior produção de leite, já que a composição do leite não foi influenciada pela fonte de vitamina D na dieta e isso impactou o balanço de energia mais negativo no grupo calcidiol. Da mesma forma, Martinez et al. (2018a) observaram aumento da energia secretada no leite de vacas que receberam calcidiol suplementadas 21 dias antes do parto. O balanço de energia não foi influenciado pela suplementação com calcidiol, assim como ocorreu no pré-parto. Contudo, Martinez et al. (2018a) observaram balanço de energia mais negativo (-7,5 Mcal/dia) em vacas recebendo calcidiol associada a uma dieta acidogênica (-126,6 mEq/kg de MS)

comparado com o presente estudo (-2,3 Mcal/dia). Esse menor balanço de energia no presente estudo se deve ao maior CMS (19,4 kg/dia), enquanto que Martinez et al. (2018a) observaram consumo médio de 18 kg/dia e maior concentração de gordura no leite (4,77%), resultado superior ao encontrado no presente estudo que foi de 3,59% no grupo calcidiol.

A variação de peso e o ECC não foram influenciados pela fonte de vitamina D. Considerando a maior produção de leite do grupo calcidiol, esperava-se maior mobilização de gordura corporal para compensar esse aumento. Contudo, a suplementação com calcidiol diminuiu a mobilização de gordura, mostrando que a suplementação com calcidiol melhorou os mecanismos homeorréticos adaptativos e foi capaz de diminuir o BEN.

A proliferação de células β , secreção de insulina e aumento da sensibilidade à insulina por meio da osteocalcina descaboxilada promove a supressão dos mecanismos de mobilização de reservas (Wolf, 2008). O calcitriol induz a síntese de osteocalcina nos osteoblastos (Wolf e Phil, 1996). Como discutido anteriormente, o calcidiol apresenta meia vida maior que o colecalciferol e está diretamente relacionado com maior concentração de calcitriol circulante (Rodney et al., 2018a).

CONCLUSÕES

A suplementação de vacas leiteiras nos últimos 21 dias pré-parto com calcidiol melhorou o metabolismo ósseo e aumentou a excreção de Ca na urina, aumentou a produção de colostro e a concentração de glicose no dia do parto, melhorou a condição energética, diminuindo a mobilização de gordura corporal e, conseqüentemente, reduzindo o balanço energético negativo e aumentou a produção de leite, de leite corrigido para gordura e energia, e a produção dos constituintes do leite. Em resumo, a suplementação com calcidiol melhora o metabolismo energético e o desempenho de vacas leiteiras no terço inicial de lactação.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores são gratos à Embrapa Gado de Leite pela disponibilização da infraestrutura, animais e laboratórios para desenvolvimento do estudo. Os autores são gratos à DSM Produtos Nutricionais Brasil S.A. (São Paulo, Brasil) pela viabilização dos aditivos e suporte financeiro ao estudo.

REFERÊNCIAS

- Abuelo, A., J. Hernández, J.L. Benedito, and C. Castillo. 2015. The importance of the oxidative status of dairy cattle in the periparturient period: Revisiting antioxidant supplementation. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 99:1003–1016. doi:10.1111/jpn.12273.
- Anderson, S.T., L.J. Kidd, M.A. Benvenuti, M.T. Fletcher, and R.M. Dixon. 2017. New candidate markers of phosphorus status in beef breeder cows. *Anim. Prod. Sci.* 57:2291–2303.
- AOAC International. 2005. *Official Methods of Analysis*. AOAC International, Gaithersburg, MD. <http://www.eoma.aoac.org>.
- Bird, E. W., and J. Weber Chen. 1961. Determination of calcium and magnesium in milk by E.D.T.A. titration. *J. Dairy Sci.* 44:1036-1046.
- Blaine, J., M. Chonchol, and M. Levi. 2014. Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 10:1257–1272. doi:10.2215/CJN.09750913.
- Block, E. 2010. Transition Cow Research – What makes sense today? Pages 75–98 in High Plains Dairy Conference.

- Box, G. E. P., and D. R. Cox. 1964. An analysis of transformations. *J. R. Stat. Soc. B* 26:211–252.
- Calamari, L., N. Soriani, G. Panella, F. Petrer, A. Minuti, and E. Trevisi. 2014. Rumination time around calving: An early signal to detect cows at greater risk of disease. *J. Dairy Sci.* 97:3635–3647. doi:10.3168/jds.2013-7709.
- Cant, J. P., D. R. Trout, F. Qiao, and N. G. Purdie. 2002. Milk synthetic response of the bovine mammary gland to an increase in the local concentration of arterial glucose. *J. Dairy Sci.* 85:494–503. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74100-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74100-3).
- Cardot, V., Y. Le Roux, and S. Jurjanz. 2008. Drinking behavior of lactating dairy cows and prediction of their water intake. *J. Dairy Sci.* 91:2257–2264. doi: 10.3168/jds.2007-0204.
- Williams, M. Engstrom, J. McGrath, and J. La Marta. 2018. Safety evaluation of dietary levels of 25-hydroxyvitamin D₃ in growing calves. *Food Chem Toxicol.* 111:641–649. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.053>.
- Chamberlin, W.G., J.R. Middleton, J.N. Spain, G.C. Johnson, M.R. Ellersieck, and P. Pithua. 2013. Subclinical hypocalcemia, plasma biochemical parameters, lipid metabolism, postpartum disease, and fertility in postparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:7001–7013. doi:10.3168/jds.2013-6901.
- Chizzotti, M. L., S. C. Valadares Filho, R. F. D. Valadares, F. H. M. Chizzotti, and L. O. Tedeschi. 2008. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. *Livest. Sci.* 113: 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.03.013>.
- Constable, P.D., A.A. Megahed, and M.W.H. Hiew. 2019. Measurement of urine pH and net acid excretion and their association with urine calcium excretion in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 102:11370–11383. doi:10.3168/jds.2019-16805.

- Contreras, G.A., and L.M. Sordillo. 2011. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34:281–289. doi:10.1016/j.cimid.2011.01.004.
- Danes, M. A. C., M. D. Hanigan, S. I. Arriola Apelo, J. D. L. Dias, M. A. Wattiaux, and G. A. Broderick. 2020. Post-ruminal supplies of glucose e casein, but not acetate, stimulate milk protein synthesis in dairy cows through differential effects on mammary metabolism. *J. Dairy Sci.* 103: 6218–6232. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-18086>.
- DeKoster, J. D., and G. Opsomer. 2013. Insulin resistance in dairy cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 29:299–322. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.04.002>.
- Diehl, A.L., J.K. Bernard, S. Tao, T.N. Smith, D.J. Kirk, D.J. McLean, and J.D. Chapman. 2018. Effect of varying prepartum dietary cation-anion difference and calcium concentration on postpartum mineral and metabolite status and milk production of multiparous cows. *J. Dairy Sci.* 101:9915–9925. doi:10.3168/jds.2018-14828.
- Duhlmeier, R., A. Hacker, A. Widdel, W. Von Engelhardt, and H. Sallmann. 2005. Mechanisms of insulin-dependent glucose transport into porcine and bovine skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:87–97. doi:10.1152/ajpregu.00502.2004.
- Elanco Animal Health. 2009. The 5-point body condition scoring system. Bulletin AI 10752. Elanco Animal Health, Greenfield, IN.
- Ferguson, J.D., D.T. Galligan, and N. Thomsen. 1994. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 77:2695–2703. doi:10.3168/jds.S0022-0302(94)77212-X.

- Fredeen, A.H., E.J. Depeters, and R.L. Baldwin. 1988. Effects of acid-base disturbances caused by differences in dietary fixed ion balance on kinetics of calcium metabolism in ruminants with high calcium demand. *J. Anim. Sci.* 66:174–184.
- Giuliodori, M.J., R.P. Magnasco, D. Becu-Villalobos, I.M. Lacau-Mengido, C.A. Risco, and R.L. De la Sota. 2013. Metritis in dairy cows: Risk factors and reproductive performance. *J. Dairy Sci.* 96:3621–3631. doi:10.3168/jds.2012-5922.
- Glosson, K.M., X. Zhang, S.S. Bascom, A.D. Rowson, Z. Wang, and J.K. Drackley. 2020. Negative dietary cation-anion difference and amount of calcium in prepartum diets: Effects on milk production, blood calcium, and health. *J. Dairy Sci.* 103:1–16. doi:10.3168/jds.2019-18068.
- Goff, J.P., A. Liesegang, and R.L. Horst. 2014. Diet-induced pseudohypoparathyroidism: A hypocalcemia and milk fever risk factor. *J. Dairy Sci.* 97:1520–1528. doi:10.3168/jds.2013-7467.
- Goff, J.P., A. Hohman, and L.L. Timms. 2020. Effect of subclinical and clinical hypocalcemia and dietary cation-anion difference on rumination activity in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 103:2591–2601. doi:10.3168/jds.2019-17581.
- Guo, J., A.K. Jones, D.I. Givens, J.A. Lovegrove, and K.E. Kliem. 2018. Effect of dietary vitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃ supplementation on plasma and milk 25-hydroxyvitamin D₃ concentration in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:3545–3553. doi:10.3168/jds.2017-13824.
- Gruber, L., M. Urdl, W. Obritzhauser, A. Schauer, J. Häusler, and B. Steiner. 2013. Influence of energy and nutrient supply pre and post partum on performance of multiparous Simmental, Brown Swiss and Holstein cows in early lactation. *Animal.* 8:58–71. doi:10.1017/S1751731113001894.

- Hernández-Castellano, L.E., L.L. Hernandez, and R.M. Bruckmaier. 2019. Review: Endocrine pathways to regulate calcium homeostasis around parturition and the prevention of hypocalcemia in periparturient dairy cows. *Animal* 14:330–338. doi:10.1017/S1751731119001605.
- Hoenderop, J.G.J., B. Nilius, and R.J.M. Bindels. 2005. Calcium absorption across epithelia. *Physiol. Rev.* 85:373–422. doi:10.1152/physrev.00003.2004.
- Horst, R. L., J. P. Goff, and T. Reinhardt. 1994. Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 77:1936–1951.
- Iwersen, M., M. Pichler, L. Roland, B. Fildschuster, I. Schwendenwein, and M. Drillich. 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. Dairy Sci.* 96:7719–7730. doi:10.3168/jds.2013-7121.
- Johnston, C. and T.J. DeVries. 2018. Short communication: Associations of feeding behavior and milk production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:1–7. doi:10.3168/jds.2017-13743
- Jones, G. 2008. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 88:582–586. doi:10.1093/ajcn/88.2.582s.
- Jørgensen R.J., N.R. Nyengaard, S. Hara, J.M. Enemark, and P.H. Andersen. 1998. Rumen motility during induced hyper- and hypocalcaemia. *Acta Vet Scand.* 39:331-8.
- Kaufman, E.I., S.J. LeBlanc, B.W. McBride, T.F. Duffield, and T.J. DeVries. 2016. Association of rumination time with subclinical ketosis in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:5604–5618. doi:10.3168/jds.2015-10509.
- Lean, I. J., J. E. P. Santos, E. Block, and H. M. Golder. 2019. Effects of prepartum dietary cation-anion difference intake on production and health of dairy cows: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 102:2103–2133. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14769>.

- Lee, N.K., H. Sowa, E. Hinoi, M. Ferron, J.D. Ahn, R. Dacquin, P.J. Mee, M.D. Mckee, D.Y. Jung, J.K. Kim, F. Mauvais-jarvis, P. Ducy, and G. Karsenty. 2007. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130:456–469.
- Liboreiro, D.N., K.S. Machado, P.R.B. Silva, M.M. Maturana, T.K. Nishimura, A.P. Brandão, M.I. Endres, and R.C. Chebel. 2015. Characterization of peripartum rumination and activity of cows diagnosed with metabolic and uterine diseases. *J. Dairy Sci.* 98:6812–6827. doi:10.3168/jds.2014-8947.
- Lieben, L., G. Carmeliet, and R. Masuyama. 2011. Calcemic actions of vitamin D: Effects on the intestine, kidney and bone. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25:561–572. doi:10.1016/j.beem.2011.05.008.
- Lopera, C., R. Zimpel, A. Vieira-Neto, F.R. Lopes, W. Ortiz, M. Poindexter, B.N. Faria, M.L. Gambarini, E. Block, C.D. Nelson, and J.E.P. Santos. 2018. Effects of level of dietary cation-anion difference and duration of prepartum feeding on performance and metabolism of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:7907–7929. doi:10.3168/jds.2018-14580.
- Mair, B., M. Drillich, D. Klein-Jöbstl, P. Kanz, S. Borchartd, L. Meyer, I. Schwendenwein, and M. Iwersen. 2016. Glucose concentration in capillary blood of dairy cows obtained by a minimally invasive lancet technique and determined with three different hand-held devices. *BMC Vet. Res.* 12:1–11. doi:10.1186/s12917-016-0662-3.
- Martinez, N., C. A. Risco, F. S. Lima, R. S. Bisinotto, L. F. Greco, E. S. Ribeiro, F. Maunsell, K. Galvão, e J. E. P. Santos. 2012. Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *J. Dairy Sci.* 95 :7158–7172. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5812>.

- Martinez, N., L.D.P. Sinedino, R.S. Bisinotto, E.S. Ribeiro, G.C. Gomes, F.S. Lima, L.F. Greco, C.A. Risco, K.N. Galvão, D. Taylor-Rodriguez, J.P. Driver, W.W. Thatcher, and J.E.P. Santos. 2014. Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97:874–887. doi:10.3168/jds.2013-7408.
- Martinez, N., L.D.P. Sinedino, R.S. Bisinotto, R. Daetz, C. Lopera, C.A. Risco, K.N. Galvão, W.W. Thatcher, and J.E.P. Santos. 2016. Effects of oral calcium supplementation on mineral and acid-base status, energy metabolites, and health of postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:8397–8416. doi:10.3168/jds.2015-10527.
- Martinez, N., R.M. Rodney, E. Block, L.L. Hernandez, C.D. Nelson, L.J. Lean, and J.E.P. Santos. 2018a. Effects of prepartum dietary cation-anion difference and source of vitamin D in dairy cows: Lactation performance and energy metabolism. *J. Dairy Sci.* 101:2544–2562. doi:10.3168/jds.2017-13737.
- Martinez, N., R.M. Rodney, E. Block, L.L. Hernandez, C.D. Nelson, I.J. Lean, and J.E.P. Santos. 2018b. Effects of prepartum dietary cation-anion difference and source of vitamin D in dairy cows: Health and reproductive responses. *J. Dairy Sci.* 101:2563–2578. doi:10.3168/jds.2017-13740.
- McGrath, M.F., R.J. Collier, D.R. Clemmons, W.H. Busby, C.A. Sweeny, and G.G. Krivi. 1991. The direct in vitro effect of insulin-like growth factors (IGFs) on normal bovine mammary cell proliferation and production of igf binding proteins. *Endocrinology* 129:671–678. doi:10.1210/endo-129-2-671.
- Nelson, C.D., B.J. Nonnecke, T.A. Reinhardt, W.R. Waters, D.C. Beitz, and J.D. Lippolis. 2011. Regulation of mycobacterium-specific mononuclear cell responses by 25-hydroxyvitamin D₃. *PLoS One* 6:1–10. doi:10.1371/journal.pone.0021674.

- Nelson, C.D., T.A. Reinhardt, J.D. Lippolis, R.E. Sacco, and B.J. Nonnecke. 2012. Vitamin D signaling in the bovine immune system: A model for understanding human vitamin D requirements. *Nutrients* 4:181–196. doi:10.3390/nu4030181.
- NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Oehlschlaeger, V., M. Wilkens, B. Schroeder, S. Daenicke, and G. Breves. 2014. Effects of 25-hydroxyvitamin D₃ on localisation and extent of gastrointestinal calcium absorption in dairy cattle. *Anim. Prod. Sci.* 54:1394–1398. doi:10.1071/AN14344.
- Oetzel, G. R., J. D. Olson, C. R. Curtis, and M. J. Fettman. 1988. Ammonium chloride and ammonium sulfate for prevention of parturient paresis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 71:3302–3309. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79935-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79935-X).
- Oliveira, W.D.C., T.P.D.E. Silva, M. Araújo, R.L. Edvan, R.L. Oliveira, and L.R. Bezerra. 2019. Changes in hematological biomarkers of Nellore cows at different reproductive stages. *Acta Sci. - Anim. Sci.* 41:1–7. doi:10.4025/actascianimsci.v41i1.45725.
- Poindexter, M.B., M.F. Kweh, R. Zimpel, J. Zuniga, C. Lopera, M.G. Zenobi, Y. Jiang, M. Engstrom, P. Celi, J.E.P. Santos, and C.D. Nelson. 2020. Feeding supplemental 25-hydroxyvitamin D₃ increases serum mineral concentrations and alters mammary immunity of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 103:805–822. doi:10.3168/jds.2019-16999.
- Reinhardt, T.A., J.D. Lippolis, B.J. McCluskey, J.P. Goff, and R.L. Horst. 2011. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Vet. J.* 188:122–124. doi:10.1016/j.tvjl.2010.03.025.

- Rico, J.E., V.V.R. Bandaru, J.M. Dorskind, N.J. Haughey, and J.W. Mcfadden. 2015. Plasma ceramides are elevated in overweight Holstein dairy cows experiencing greater lipolysis and insulin resistance during the transition from late pregnancy to early lactation. *J. Dairy Sci.* 98:1–14. doi:10.3168/jds.2015-9519.
- Rodney, R. M., N. Martinez, E. Block, L. L. Hernandez, P. Celi, C. D. Nelson, J. E. P. Santos, and I. J. Lean. 2018a. Effects of prepartum dietary cation-anion difference and source of vitamin D in dairy cows: Vitamin D, mineral, and bone metabolism. *J. Dairy Sci.* 101:2519–2543. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13737>.
- Rodney, R.M., N.P. Martinez, P. Celi, E. Block, P.C. Thomson, G. Wijffels, D.R. Fraser, J.E.P. Santos, and I.J. Lean. 2018b. Associations between bone and energy metabolism in cows fed diets differing in level of dietary cation-anion difference and supplemented with cholecalciferol or calcidiol. *J. Dairy Sci.* 101:1–21. doi:10.3168/jds.2017-14033.
- Rodríguez, E.M., A. Arís, and A. Bach. 2017. Associations between subclinical hypocalcemia and postparturient diseases in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:7427–7434. doi:10.3168/jds.2016-12210.
- Rude, R.K., and H.E. Gruber. 2004. Magnesium deficiency and osteoporosis : animal and human observations. *J. Nutr. Biochem.* 15:710–716. doi:10.1016/j.jnutbio.2004.08.001.
- Santos, J. E. P., I. J. Lean, H. Golder, and E. Block. 2019. Meta-analysis of the effects of prepartum dietary cation-anion difference on performance and health of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 102:2134–2154. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14628>.
- Schäff, C., S. Börner, S. Hacke, U. Kautzsch, H. Sauerwein, and S.K. Spachmann. 2013. Increased muscle fatty acid oxidation in dairy cows with intensive body fat mobilization during early lactation. *J. Dairy Sci.* 96:1–12. doi:10.3168/jds.2013-6812.

- Smith, B. I., G. A. Donovan, C. A. Risco, R. Littell, C. Young, and L. H. Stanker. 1998. Comparison of various antibiotic treatments for cows diagnosed with toxic puerperal metritis. *J. Dairy Sci.* 81:1555–1562.
- Sarruge, J. R., e H. P. Haag. 1974. *Análise química das plantas*. 56 p. Piracicaba, ESALQ.
- Sundrum, A. 2015. Metabolic disorders in the transition period indicate that the dairy cows' ability to adapt is overstressed. *Animals* 5:978–1020. doi:10.3390/ani5040395.
- Vieira-Neto, A., I.R.P. Lima, F. Lopes, C. Lopera, R. Zimpel, L.D.P. Sinedino, K.C. Jeong, K. Galvão, W.W. Thatcher, C.D. Nelson, and J.E.P. Santos. 2017. Use of calcitriol to maintain postpartum blood calcium and improve immune function in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:5805–5823. doi:10.3168/jds.2016-12506.
- Weiss, W.P., E. Azem, W. Steinberg, and T.A. Reinhardt. 2015. Effect of feeding 25-hydroxyvitamin D₃ with a negative cation-anion difference diet on calcium and vitamin D status of periparturient cows and their calves. *J. Dairy Sci.* 98:5588–5600.
- Wilkens, M.R., I. Oberheide, B. Schröder, E. Azem, W. Steinberg, and G. Breves. 2012. Influence of the combination of 25-hydroxyvitamin D₃ and a diet negative in cation-anion difference on periparturient calcium homeostasis of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:151–164. doi:10.3168/jds.2011-4342.
- Wolf, G. 2008. Energy regulation by the skeleton. *Nutr. Rev.* 66:229–233. doi:10.1111/j.1753-4887.2008.00027.x.
- Wolf, G., and D. Phil. 1996. Function of the bone protein osteocalcin : Definitive evidence. *Nutr. Rev.* 54:332–333.
- Zhao, F., and A.F. Keating. 2007. Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 90:E76–E86. doi:10.3168/jds.2006-470.

Zimpel, R., M. B. Poindexter, A. Vieira-Neto, E. Block, C. D. Nelson, C. R. Staples, W. W. Thatcher, and J. E. P. Santos. 2018. Effect of dietary cation-anion difference on acid-base status and dry matter intake in dry pregnant cows. *J. Dairy Sci.* 101: 8461–8475. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14748>.

IMPLICAÇÕES

Neste estudo, foi mostrado o potencial da utilização de dieta acidogênica no pré-parto associada com a suplementação com vitamina D ativa, apresentando grande potencial de substituição do colecalciferol por calcidiol em dietas de vacas leiteiras na concentração de 3,0 mg/dia.

O NRC (2001) recomenda o uso de 0,5 mg de colecalciferol para uma vaca com 650 kg de peso vivo. Contudo, a suplementação com colecalciferol parece não ser suficiente para diminuir a incidência de hipocalcemia subclínica. Dessa forma, a utilização de um metabólito da vitamina D mais ativo e com maior meia vida tem potencial de apresentar resultados satisfatórios na redução da hipocalcemia e outras doenças no pós-parto imediato, além de aumentar o desempenho produtivo. E isto foi demonstrado no presente estudo.

A avaliação do Ca sanguíneo feita em laboratório quatro horas após a coleta resultou em maior variação em torno da média, o que prejudicou a análise estatística, apesar da grande diferença entre os tratamentos. Em estudos futuros, realizar a avaliação de PTH imediatamente após a coleta devido à grande instabilidade deste metabólito.

A utilização de hematologia global não permitiu a observação de efeitos de tratamento. Portanto, nesse tipo de estudo, os animais devem ser desafiados com determinado patógeno, como por exemplo, o *E. coli* causador da mastite para verificação mais específica da ação do sistema imune no organismo em resposta à vitamina D.

Novos estudos devem ser realizados com o intuito de avaliar os efeitos específicos no sistema imune, da suplementação com calcidiol no pré-parto, com a hipótese de que o calcidiol melhora a resposta imune do animal no pós-parto imediato. Em nosso estudo, essa relação não pôde ser observada com clareza. Nesse contexto, estudos posteriores devem avaliar os efeitos do calcidiol nos receptores da vitamina e nos transportadores de glicose, para elucidar os efeitos do calcidiol no metabolismo energético da vaca leiteira no período de transição e explorar os possíveis benefícios do calcidiol por um maior período de tempo como no terço médio de lactação.