



**IZABELLA CAROLINA DE OLIVEIRA RIBEIRO**

**CALCIUM BALANCE, BONE DENSITY, AND  
PERFORMANCE OF LATE-LACTATION DAIRY COWS  
WITH SUPRAPHYSIOLOGICAL CONCENTRATION OF  
BLOOD VITAMIN D**

**LAVRAS-MG  
2021**

**IZABELLA CAROLINA DE OLIVEIRA RIBEIRO**

**CALCIUM BALANCE, BONE DENSITY, AND PERFORMANCE OF LATE-LACTATION DAIRY COWS WITH SUPRAPHYSIOLOGICAL CONCENTRATION OF BLOOD VITAMIN D**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Ribeiro, Izabella Carolina de Oliveira.

Calcium balance, bone density, and performance of late-lactation dairy cows with supraphysiological concentration of blood vitamin D / Izabella Carolina de Oliveira Ribeiro. - 2021.

83 p.

Orientador(a): Marcos Neves Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Calcidiol. 2. Metabolismo mineral. 3. Remodelação óssea. I. Pereira, Marcos Neves. II. Título.

**IZABELLA CAROLINA DE OLIVEIRA RIBEIRO**

**CALCIUM BALANCE, BONE DENSITY, AND PERFORMANCE OF LATE-LACTATION DAIRY COWS WITH SUPRAPHYSIOLOGICAL CONCENTRATION OF BLOOD VITAMIN D**

**BALANÇO DE CÁLCIO, DENSIDADE ÓSSEA E DESEMPENHO DE VACAS LEITEIRAS NO FINAL DA LACTAÇÃO COM CONCENTRAÇÃO SUPRAFISIOLÓGICA DE VITAMINA D NO SANGUE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 30 de março de 2021.

Dr. Marcos Neves Pereira – UFLA

Dr. Antônio Carlos Lacreta Júnior – UFLA

Dr. Erick Darlisson Batista - UFLA

Dr<sup>a</sup>. Renata Apocalypse Nogueira Pereira – EPAMIG

Dr<sup>a</sup>. Ozana de Fátima Zacaroni - UFG

Dr. Marcos Neves Pereira

Orientador

**LAVRAS-MG  
2021**

“Mares calmos não fazem bons marinheiros”

Autor desconhecido

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, pela minha vida, por ter me guiado até aqui e ter me permitido realizar esta jornada. Obrigado Senhor.

Agradeço a todos que, com ações ou palavras, contribuíram na execução de todas as etapas deste trabalho.

Em especial agradeço imensamente a minha família. Aos meus pais, Regina e José Roberto, que são como estrelinhas no céu e estão brilhando de felicidade por essa conquista que é para vocês e por vocês. A minha filha Lis que me encoraja a persistir e procurar o melhor todo dia. As minhas irmãs Carla e Michelle, e a minha sobrinha Alice por todo apoio, paciência, carinho e amor.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da UFLA, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo apoio neste presente trabalho.

Ao meu orientador, prof. Dr. Marcos Neves Pereira, pela oportunidade e pelos conhecimentos compartilhados.

A Rayana Brito Silva, por toda a ajuda, puxões de orelha e palavras de incentivo durante toda essa etapa.

Aos doutores pelas contribuições no trabalho na banca de defesa da qualificação e tese, Lacrete Júnior, Marina Danes, Erick Batista, Ozana Zacaroni, Renata Apocalypse, Rayana Silva, pelas contribuições no trabalho.

Aos amigos de pós-graduação, pelo apoio, conhecimentos compartilhados, colaboração e amizade.

A todos do Grupo do Leite pelos conhecimentos, pela colaboração nos experimentos e nas coletas e pelo acolhimento.

Aos funcionários da Fazenda São Francisco, Josi, Tião, Geraldo, Carlinhos e Dona Carmen e do Laboratório de Pesquisa Animal/DZO pela disposição e colaboração. Obrigada pela ajuda, vocês contribuíram muito para essa pesquisa.

Aos bons e sinceros amigos que a UFLA e Lavras me proporcionou, e aos amigos de longa data, pelo apoio, companheirismo e amizade.

Enfim a todos que contribuíram de alguma forma para a minha formação colaborando para que eu chegasse aonde cheguei. Muito Obrigada!

## Resumo Geral

A vitamina D pode afetar o metabolismo do cálcio (Ca), remodelação óssea e desempenho da lactação de vacas leiteiras. Para avaliar o metabolismo ósseo é importante a padronização da técnica de análise de densitometria óptica radiográfica. Objetivou-se padronizar a técnica de densitometria óptica radiográfica em bovinos leiteiros e correlacionar os valores com idade, peso e marcadores séricos; avaliar o desempenho da lactação, a retenção corporal de Ca e a densidade óssea de vacas leiteiras em final de lactação. Foram avaliadas 30 vacas holandesas ( $230 \pm 137$  dias de lactação, DEL) submetidas a concentrações fisiológica (Phy) ou suprafisiológica (Supra) de vitamina D (calcidiol, 25(OH)D) no sangue durante 12 semanas. Com o avançar da idade houve aumento da densidade mineral óssea (DMO). Animais mais velhos apresentaram maior peso e menor concentração sanguínea de fósforo e telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX-1). Com avançar do DEL houve aumento do peso, cálcio total e cálcio ionizado. A DMO foi maior para o carpo acessório e, se correlacionou positivamente com cálcio total e cálcio ionizado das regiões do carpo acessório, e metacarpo córtex lateral, medial e medular. Peso corporal das vacas apresentou correlação positiva com a DMO das radiografias do córtex lateral, medial e medular do metacarpo. A fosfatase alcalina do osso correlacionou negativamente com a DMO do metacarpo lateral. A concentração plasmática média de 25(OH)D no grupo Supra foi duas vezes maior que para o grupo Phy. As concentrações de Ca total e Ca ionizado foram aumentadas no grupo Supra nos dias 28 e 56. Vacas em Supra excretaram mais Ca na urina na semana 12 do que vacas em Phy. Os marcadores de deposição óssea osteocalcina e fosfatase alcalina óssea foram reduzidos no grupo Supra no dia 84. Houve tendência de redução da densidade mineral óssea da região do carpo acessório e medular do metacarpo com Supra, sugestiva de osteoporose. O alto nível de vitamina D foi associado ao aumento da produção de leite e, não teve efeito sobre o consumo de matéria seca (CMS). O leite corrigido por energia, eficiência alimentar, escore de condição corporal, ganho de peso corporal e digestibilidade aparente do trato total da matéria seca e da matéria orgânica não diferiram entre tratamentos. Ao grupo Supra foi associada redução na contagem de células somáticas (CCS) do leite. Conclui-se que a DMO determinada por densitometria óptica em imagem radiográfica é uma metodologia que pode ser reproduzida. Vacas leiteiras expostas por 12 semanas a concentração suprafisiológica de 25(OH)D mesmo

mantendo CMS semelhante, produziram mais leite com menor CCS, tiveram maiores concentrações de Ca no sangue e excreção na urina, reduziram os marcadores de deposição mineral óssea e a densidade mineral óssea.

**Palavras-chave:** Calcidiol. Cálcio. Metabolismo mineral. Remodelação óssea. Vacas Leiteiras.



## General Abstract

Vitamin D can affect calcium (Ca) metabolism, bone turnover and, lactation performance of dairy cows. To assess bone metabolism, it is important to standardize the technique of radiographic optical densitometry analysis. The objective was to standardize the radiographic optical densitometry technique in dairy cattle and to correlate the values with age, weight and, serum markers; to evaluate lactation performance, body Ca retention and, bone density of dairy cows in late lactation. Thirty Holstein cows ( $230 \pm 137$  days in milk, DIM) submitted to physiological (Phy) or supraphysiological (Supra) concentrations of vitamin D (calcidiol, 25(OH)D) in blood for 12 weeks were evaluated. With advancing age, bone mineral density (BMD) increased. Older animals had higher weight and lower blood concentration of phosphorus and carboxyterminal telopeptide of collagen type I. With advancing DIM, there was an increase in weight, total calcium, and ionized calcium. BMD was higher for the accessory carpus and correlated positively with total calcium and ionized calcium from the accessory carpus, metacarpal, lateral, medial, and medullary cortex regions. Body weight of the cows showed a positive correlation with BMD on radiographs of the lateral, medial and medullary metacarpal cortex. Bone alkaline phosphatase correlated negatively with lateral metacarpal BMD. The mean plasma concentration of 25(OH)D in the Supra group was twice as high as in the Phy group. Total Ca and ionized Ca concentrations were increased in the Supra group on days 28 and 56. Cows on Supra excreted more Ca in urine at week 12 than cows on Phy. Bone deposition markers osteocalcin and bone alkaline phosphatase were reduced in the Supra group on day 84. There was a trend towards reduced bone mineral density in the accessory carpal and metacarpal medullary region with Supra, suggestive of osteoporosis. The high level of vitamin D was associated with increased milk production and did not affect dry matter intake (DMI). The energy corrected milk, feed efficiency, body condition score, body weight gain, and apparent digestibility of the total tract of dry matter and organic matter did not differ between treatments. The Supra group was associated with a reduction in milk somatic cell count (SCC). It is concluded that the BMD determined by optical densitometry in radiographic images is a methodology that can be reproduced. Dairy cows exposed to a supraphysiological concentration of 25(OH)D for 12 weeks, even with similar DMI, produced more milk with lower CCS, had higher concentrations of Ca in

the blood and excretion in the urine, reduced markers of bone mineral deposition and bone mineral density.

**Key words:** Bone remodeling. Calcidiol. Calcium. Dairy cows. Mineral metabolism.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
Figura 1 – Via metabólica geral da vitamina D.....	19
<b>SEGUNDA PARTE</b>	
<b>ARTIGO 1</b>	
Figura 1 – Penetrômetro, referência densitométrica.....	58
Figura 2 – Carpo acessório do membro torácico esquerdo.....	58
Figura 3 – Córtex lateral do metacarpo do membro torácico esquerdo. A: córtex lateral. B: córtex medial (6 cm da superfície do osso subcondral da epífise proximal do metacarpo).....	59
Figura 4 – Região medular do metacarpo do membro torácico esquerdo (3 cm da superfície do osso subcondral da epífise proximal do metacarpo).....	59
<b>ARTIGO 2</b>	
Figure 1 – Distribution of cows with physiological (Phy) (A) and supraphysiological (Supra) (B) blood concentrations of 25(OH)D on days 28 and 84 (15 cows sampled twice on each vitamin D level).....	81
Figure 2 – Concentration of ionized calcium in serum on treatment Phy (■) and Supra (■). <i>P</i> -value: 0.01 for treatment, < 0.01 for day, and 0.05 for the interaction of treatment and day. Slice option of SAS: <sup>a</sup> <i>P</i> ≤ 0.01, <sup>b</sup> <i>P</i> = 0.08.....	82
Figure 3 – Concentration of total Ca in serum on treatment Phy (■) and Supra (■). <i>P</i> -value: 0.03 for treatment, < 0.01 for day, and 0.03 for the interaction of treatment and day. Slice option of SAS: <sup>a</sup> <i>P</i> ≤ 0.01, <sup>b</sup> <i>P</i> = 0.14.....	82
Figure 4 – Daily milk yield of cows with Physiological (Phy) (---○---) and Supraphysiological (Supra) (—●—) plasma concentration of 25(OH)D and the mean daily Temperature-Humidity Index (THI) inside the barn (■). <i>P</i> -values: < 0.01 for Vit D, < 0.01 for day, and 0.91 for the interaction of Vit D and day. cv = covariate ( <i>P</i> = 0.95). Slice option of SAS: <sup>a</sup> <i>P</i> ≤ 0.05, <sup>b</sup> <i>P</i> ≤ 0.10 and <sup>c</sup> <i>P</i> ≤ 0.15.....	83

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>ARTIGO 1</b>	
Tabela 1 –	Densidade mineral óssea (mm Al), peso vivo (Kg) e concentrações no sangue (mg/dL) de cálcio total, cálcio ionizado, fósforo e magnésio de vacas leiteiras com idade menor ( $1157 \pm 217$ dias. N = 12) ou maior ( $1897 \pm 338$ dias. N = 17) que 48 meses aos 218 (D0) e aos 302 (D84) ( $\pm 131$ ) dias em lactação (DEL) e concentrações no sangue (ng/mL) de osteocalcina, fosfatase óssea e telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX-1) aos $302 \pm 131$ dias em lactação.....
	53
Tabela 2 –	Densidade mineral óssea (mm Al), idade (dias), peso vivo (Kg) e concentrações no sangue (mg/dL) de cálcio total, cálcio ionizado, fósforo e magnésio de 29 vacas Holandesas aos 218 e 302 ( $\pm 131$ ) dias em lactação.....
	54
Tabela 3 –	Coeficiente de correlação linear entre a densidade mineral óssea (mm Al) do carpo acessório, metacarpo córtex lateral, metacarpo córtex medial e região medular do metacarpo e a idade (dias), peso vivo (Kg) e concentração no sangue (mg/dL) de cálcio total (CaT), cálcio ionizado (CaI), fósforo (P) e magnésio (Mg) de 29 vacas Holandesas aos 218 e 302 ( $\pm 131$ ) dias em lactação.....
	55
Tabela 4 –	Densidade mineral óssea (mm Al), idade (dias), peso vivo (Kg) e concentrações no sangue (ng/mL) de osteocalcina, fosfatase óssea e telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX-1) de 29 vacas Holandesas aos $302 \pm 131$ dias em lactação.....
	56
Tabela 5 –	Coeficiente de correlação linear entre a densidade mineral óssea (mm Al) do carpo acessório, metacarpo córtex lateral, metacarpo córtex medial e região medular do metacarpo e a idade (dias), peso vivo (Kg) e concentração no sangue (ng/mL) de osteocalcina, fosfatase óssea e telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX-1) de 29 vacas Holandesas aos $302 \pm 131$ dias em lactação.....
	57
<b>ARTIGO 2</b>	
Table 1 –	Composition of the experimental basal diet.....
	74
Table 2 –	Concentration of Ca and P (Mean $\pm$ SD) in feeds, orts, feces, urine, and milk of cows with physiological (Phy) or suprphysiological (Supra) blood concentrations of 25(OH)D on weeks 4 and 12.....
	75

Table 3 –	Table 3. Concentrations of plasma 25(OH)D and serum osteocalcin (OC), bone alkaline phosphatase (BAP) and C-terminal telopeptide of type 1 collagen (CTX-1) on cows with physiological (Phy) or supraphysiological (Supra) blood concentrations of 25(OH)D on days 28 and 84.....	76
Table 4 –	Serum concentrations of Mg, ionized Ca, total Ca, and P on cows with physiological (Phy) or supraphysiological (Supra) blood concentrations of 25(OH)D.....	77
Table 5 –	Glomerular filtration rate (GFR), Ca and P balance, and the fractional excretion rate of Ca (kER) on cows with physiological (Phy) or supraphysiological (Supra) blood concentrations of 25(OH)D on weeks 4 and 12.....	78
Table 6 –	Bone optical density (mm Al) of cows with physiological (Phy) or supraphysiological (Supra) blood concentrations of 25(OH)D.....	79
Table 7 –	Dry matter intake (DMI), lactation performance, linear somatic cell count (Linear SCC), milk urea-N (MUN), feed efficiency, body weight (BW), body condition score (BCS), and the total apparent digestibility of dry matter (DMD) and organic matter (DMO) on cows with physiological (Phy) or supraphysiological (Supra) blood concentrations of 25(OH)D.....	80

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE.....</b>	<b>15</b>
<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2 – REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.1 – Rotas metabólicas da vitamina D.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.2 – Concentração e toxicidade da vitamina D.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.3 – Ações da vitamina D no metabolismo mineral.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1.4 – Outras ações da vitamina D.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 – Técnicas de avaliação de densidade óssea.....</b>	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>32</b>
<b>SEGUNDA PARTE.....</b>	<b>41</b>
<b>ARTIGO 1 - Técnica de medição da densidade mineral óssea em vacas leiteiras a partir da densitometria óptica em radiografias digitais.....</b>	<b>42</b>
<b>ARTIGO 2 - Calcium balance, bone density, and performance of late- lactation dairy cows with supraphysiological concentration of blood vitamin D.....</b>	<b>60</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

O papel da vitamina D na manutenção da homeostase do cálcio e fósforo em vacas leiteiras tem sido demonstrado há muitos anos (Goff, 2000). Mais recentemente, tem sido demonstrado o efeito da vitamina D sobre o sistema imunológico (Nelson et al., 2010a; Lippolis et al., 2011) e o metabolismo ósseo (Rodney et al., 2018) de vacas leiteiras.

A vitamina D é um pró-hormônio provindo da exposição solar sintetizada endogenamente ou da suplementação na dieta na forma de ergocalciferol (D<sub>2</sub>) e colicalciferol (D<sub>3</sub>) (Horst et al. 1981). O processo de ativação da vitamina D na pele, é depende da exposição solar, pois os raios ultravioletas ativam o precursor esteroide 7-deidrocolesterol que atua no colecalciferol formado na pele pela ação não enzimática (MacLaughlin et al., 1982; Stryer, 1995).

A vitamina D no organismo é inativa, e para se tornar ativa deve ser hidroxilada duas vezes, no fígado ocorre a primeira hidroxilação formando o 25(OH)D (calcidiol) (Horst et al., 1986). O calcidiol é então transportado majoritariamente ao rim onde ocorre a outra hidroxilação para formação de 1,25(OH)<sub>2</sub>D (calcitriol) a forma biologicamente ativa (Horst et al., 1994). O calcitriol se liga ao sítio ativo da vitamina D (VDR), que está presente na maioria dos tecidos do corpo, para atuar na homeostase de cálcio (Goff, 2000), nas funções imunológicas (Lippolis et al., 2011) e no metabolismo mineral (Rodney et al., 2018).

Calcidiol é o principal metabólito circulante da vitamina D, por isto a concentração no plasma de calcidiol é considerado o melhor indicador do estado de vitamina D de um animal (Sommerfeldt et al., 1983; Horst, 1976). Concentrações de calcidiol no sangue inferiores a 10 ng/mL são indicativas de deficiência de vitamina D (Horst et al., 1994). Porém algumas pesquisas mais recentes relatam que concentrações de calcidiol abaixo de 30 ng/mL representam um estado de insuficiência de vitamina D (Hollis, 2008; Nelson et al., 2012). Concentrações de calcidiol normais em bovinos são considerados de 20 a 50 ng/mL, (Horst e Littledike, 1982). Entretanto bovinos em exposição solar sem suplementação de vitamina D têm concentrações séricas de calcidiol entre 40 a 100 ng/mL (Nelson et al., 2016).

Para alcançar este nível de calcidiol no sangue a suplementação alimentar de vitamina D é utilizada. O NRC (2001) recomenda a suplementação diária de 21.000 UI

de vitamina D<sub>3</sub>, para garantir a homeostase da Ca, (~ 800 a 1.000 UI/kg de MS) para vacas Holandesas em lactação (calculadas para 680 kg de PC). Porém um levantamento feito do status da vitamina D em 12 rebanhos amostrando 702 vacas leiteiras nos EUA, mostrou que atualmente é comum utilizar a suplementação com 30.000 a 50.000 UI/d para vacas em lactação (Nelson et al., 2016).

Um dos motivos da prática atual de suplementação com doses maiores às recomendadas pelo NRC (2001), seria o efeito benéfico da vitamina D no sistema imunológico em bovinos leiteiros (Nelson et al., 2010a). Porém não está definido o nível ideal de vitamina D necessário para garantir o bom funcionamento do sistema imune (Cantorna et al., 2004). No entanto, devemos usar essa suplementação com mais cautela pois a deficiência prolongada de vitamina D causa raquitismo, mas a supervitaminose D também pode causar osteoporose, pois induz o aumento da atividade osteoclástica (Selby et al., 1995).

A suplementação de vitamina D é feita seguindo recomendação do NRC para rebanhos leiteiros, que não consideraram a necessidade de reposição de Ca, perdido no início da lactação. Sendo assim vacas leiteiras suplementadas acima do recomendado podem estar contribuindo para a osteoporose em vacas maduras, por não alocar quantidade adequada de Ca o suficiente para permitir a deposição óssea durante a lactação.

O objetivo deste trabalho foi padronizar a técnica de densitometria óptica radiográfica (DOR) e parametrizar valores de densidade mineral em bovinos leiteiros adultos, correlacionando-os com idade, peso e marcadores séricos, que serviram para a medição da densidade óssea de vacas em fase final da lactação submetidas a concentrações supra-fisiológicas de 25(OH)D no sangue por 12 semanas e avaliar o consumo, desempenho leiteiro e o balanço de Ca e P. Nossa hipótese foi que o aumento de 25(OH)D no sangue melhoraria o balanço de Ca e P, a mineralização óssea e o desempenho leiteiro.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1.1 Rotas metabólicas da vitamina D

Nos bovinos a vitamina D necessária à adequada função do organismo provém da dieta ou é sintetizada endogenamente. A vitamina D provinda da exposição solar representa 80 a 90% da vitamina D total no organismo, sendo assim 10 a 20% provém da dieta (Holick, 2008). O processo de ativação da vitamina D<sub>3</sub> é dependente da ação dos raios ultravioleta solares que ativam o precursor esteroideal 7-deidrocolesterol que normalmente está presente na pele dos mamíferos, e atua no colecalciferol formado na pele pela ação não enzimática (MacLaughlin et al., 1982; Stryer, 1995). A vitamina também pode ser ingerida através da dieta na forma de ergocalciferol (D<sub>2</sub>) e colicalciferol (D<sub>3</sub>), essas duas formas são inativas. As vacas são capazes de utilizar ambas as formas, mas a vitamina D<sub>3</sub> mostrou ser mais eficiente no aumento dos níveis séricos de 25(OH)D do que a vitamina D<sub>2</sub> (Horst et al. 1981, Horst, Reinhardt e Reddy 2005). A vitamina D<sub>2</sub> é produzida por irradiação UV do ergosterol à partir de fungos, porém a concentração de vitamina D<sub>2</sub> dentre as forragens é altamente variável e relativamente baixa (Wallis et al., 1958, Horst et al., 1994).

Tanto a vitamina D<sub>2</sub> quanto a vitamina D<sub>3</sub> após ser ativada com a presença de irradiação ou suplementada na dieta devem passar por duas etapas de hidroxilação para se tornar um hormônio ativo. A vitamina D apresenta alta afinidade pelo fígado e é rapidamente transportada, onde é hidroxilada pela enzima 25-hidroxilase e formado 25(OH)D, e liberado na corrente sanguínea (Bikle, 2014; Horst et al., 1986). O 25(OH)D é relativamente inativo, porém já foi demonstrado que se liga ao receptor de vitamina D (VDR) (Beckman et al., 1989; Bergadà et al., 2014). Ocorre então outra hidroxilação de 25(OH)D, primariamente no rim e é realizada pela enzima 1 $\alpha$ -hidroxilase, que forma a 1,25(OH)<sub>2</sub>D a forma biologicamente ativa (Horst et al., 1994). A enzima 1 $\alpha$ -hidroxilase é codificada pelo gene CYP27B1. O 1,25(OH)<sub>2</sub>D se liga ao sitio ativo da vitamina D (VDR), um receptor hormonal nuclear que está presente na maioria dos tecidos do corpo. Para afetar a função imunológica e o metabolismo mineral, o hormônio ativo deve se ligar ao VDR para ativar o ligante, permitindo a absorção de minerais (Rodney et al., 2018), ele também regula a expressão de diversos genes que é dependente da ligação ao VDR (Kemmis et al., 2006). Sendo assim grande parte da função da vitamina D está relacionado a concentração e formação de 1,25(OH)<sub>2</sub>D no organismo animal. Portanto, a concentração

de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  é regulada firmemente para controlar seus efeitos na expressão gênica. Quando há um excesso de  $25(\text{OH})\text{D}$  no organismo, há uma rota de inativação que é catalisada pela 25-hidroxivitaminaD-24-hidroxilase que é codificada pelo gene CYP24A1. Esta enzima converte os metabólitos  $25(\text{OH})\text{D}$  e  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  em  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  e  $1,24,25(\text{OH})_3$ , que geralmente são considerados inativos (Jones et al., 2012). A transcrição do gene CYP24A1 é fortemente induzida por  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  como parte de um feedback rigoroso que controla a atividade de sinalização da vitamina D (Engstrom et al., 1984) (figura 1).

A atividade dos genes CYP27B1 e CYP24A1 é estreitamente regulada para que haja o controle da concentração de cálcio e fósforo no organismo. O CYP27B1 renal, que catalisa a enzima  $1\alpha$ -hidroxilase, é induzido pelo hormônio da paratireóide (PTH), a fim de estimular as vias de reabsorção do cálcio para aumentar o cálcio sérico (DeLuca, 1977). Este aumento no CYP27B1 resulta em concentrações mais altas de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  que causam um aumento na atividade osteoclástica e na absorção intestinal de cálcio (Fraser e Kodicek, 1970). O aumento das concentrações de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  induz o CYP24A1 como um mecanismo de feedback negativo (Jones et al., 1998). Contudo, a indução da CYP24A1 mediada por  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  é atenuada pelo PTH no rim (Reinhardt e Horst, 1990; Shinki et al., 1992). No osteoblasto, o PTH aumenta a indução do CYP24A1 mediada por  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (Armbrecht et al., 1998; Yang et al., 2001). O gene CYP24A1 é expresso na maioria, senão em todas, as células alvo que contêm o VDR (Jones et al., 1998). O CYP24A1 utiliza a forma ativa e  $25(\text{OH})\text{D}$ , apesar de ter maior afinidade com o hormônio ativo, para controlar a concentração de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  e atuar como uma enzima controladora para impedir a expressão extensa de genes devido ao  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (Jones et al., 1998; Omdahl et al., 2004).

O fator de crescimento de fibroblastos de proteínas 23 (FGF23) também está envolvido na via da vitamina D e está principalmente envolvido no metabolismo do fósforo (Larkins et al., 1973). A proteína é secretada pelos osteócitos em resposta a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  e fosfato elevados, em um feedback negativo, suprime a atividade do CYP27B1, diminuindo a ativação da vitamina D, além de induzir a expressão do CYP24A1 no rim, aumentando o catabolismo de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (Kolek et al., 2005; Perwad et al., 2007).

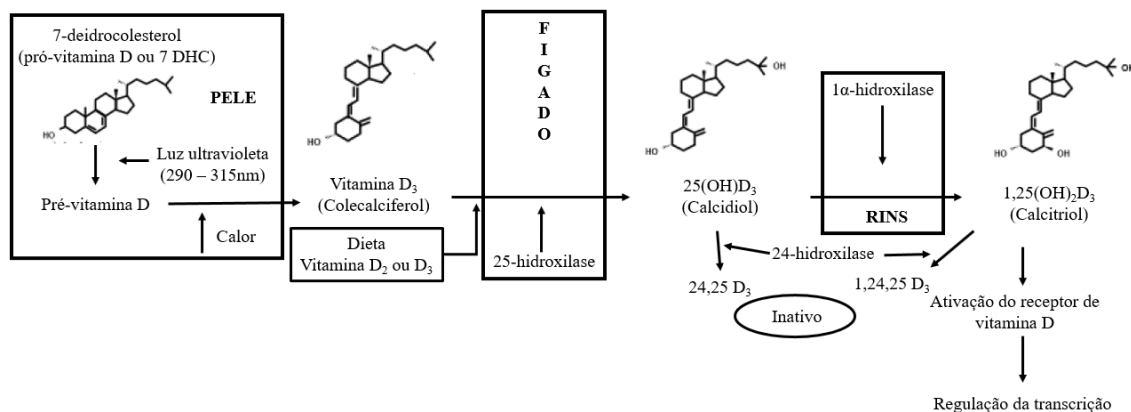


Figura 1. Via metabólica geral da vitamina D. O 7-deidrocolesterol (7-DHC), está presente na pele e por ação da luz ultravioleta e do calor, isomeriza-se em coleciferol na pele ou pode ser suplementado por meio da alimentação. O coleciferol é então transportado ao fígado, onde prontamente sofre ação da 25-hidroxilase, transformando-se em 25-hidroxivitamina (25(OH)D). Quando essa molécula chega aos rins, é ativada em 1,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub> pela enzima 1α-hidroxilase, que é fortemente regulada e expressa em rins e macrófagos em bovinos. O 1,25(OH)<sub>2</sub>D ativa o VDR e, principalmente em altas concentrações de 25(OH)D e 1,25(OH)<sub>2</sub>D, induz seu próprio catabolismo através da 24-hidroxilase. Estes metabólitos são posteriormente metabolizados e excretados na bile. Modificado de Galvão et al., 2013; Nelson e Merriman, 2014.

### 2.1.2 Concentração e toxicidade da vitamina D

A concentração de 25(OH)D no plasma é considerada o melhor indicador do estado de vitamina D de um animal, pois é o principal metabólito circulante da vitamina D e relativamente estável em bovinos (Sommerfeldt et al., 1983; Horst, 1976). O calcidiol apresenta uma meia vida no organismo de 2 a 3 semanas, enquanto 1,25(OH)<sub>2</sub>D tem uma meia-vida de 4 a 6 horas (Hagenau et al., 2009). A vitamina D tem meia-vida de aproximadamente 24 horas em humanos e parece estar sendo armazenada nos tecidos e liberada lentamente, a fim de otimizar a disponibilidade de vitamina D (Clemens et al. 1982). Foi relatado que bovinos leiteiros apresentam concentrações séricas normais de 25(OH)D variando de 20 a 50 ng/mL, porém um levantamento feito nos EUA do status de vitamina D mostrou uma concentração sérica média de 25(OH)D de 68 ng/mL (Horst et al., 1994; Nelson et al., 2016).

É difícil determinar a quantidade exata em que a toxicidade da vitamina D ocorre. Além disso, o mecanismo exato que leva à toxicidade é indefinido. Mas sabe-se que o fornecimento em excesso de vitamina D<sub>3</sub> causa intoxicação. Em humanos, os sintomas

são descritos após um a três meses de ingestão da dose igual ou superior a 40.000 UI de colecalciferol considerada superdose tóxica (Holick, 2006). Doses excessivas de vitamina D induz aumento da absorção intestinal de Ca e reabsorção óssea, induzindo hipercalcemia, nefrocalcinose, atividade osteoclástica aumentada e osteoporose em humanos (Selby et al., 1995) e ratos (Lindgren e DeLuca, 1982). Há várias hipóteses para explicar o mecanismo de toxicidade. Em vacas leiteiras o mais possível é que aumento da ingestão de vitamina D aumenta a concentração sérica do hormônio ativo, calcitriol, que resulta em expressão gênica exacerbada (Jones, 2008; Weiss et al., 2015).

Um estudo com humanos sugere que a conversão de vitamina D<sub>3</sub> em 25(OH)D é reduzida em concentrações elevadas de D<sub>3</sub> (Heaney et al., 2008). Se isso ocorrer em todos os mamíferos, assim como nos bovinos, maiores concentrações de 25(OH)D circulantes podem ser obtidas com suplementação direta. O fornecimento de 25(OH)D parece não causar intoxicação e aumenta a concentração de calcidiol no sangue comparado a suplementação de D<sub>3</sub>, apesar da síntese de 1,25(OH)<sub>2</sub>D a partir de 25(OH)D ser regulada, aumentando proporcionalmente a concentração de calcitriol no sangue e também dos metabolitos de retirada da vitamina D da corrente sanguínea 1,24,25(OH)<sub>3</sub> e 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Rodney et al., 2018).

A administração de um análogo de calcitriol via intramuscular em vacas pré-parto reduziram a incidência de hipocalcemia clínica comparado com vacas não tratadas, porém a síntese de calcitriol endógeno foi prejudicada no pós-parto e resultaram em hipocalcemia clínica (Goff et al., 1987). Quando 1,25(OH)<sub>2</sub>D encontra-se em concentrações elevadas no organismo, aumenta a expressão da enzima 24-hidroxilase, que aumenta a conversão de 25(OH)D em 1,24,25(OH)<sub>3</sub> e 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> que parece ter atividade metabólica limitada ou nula diminuindo a biodisponibilidade da vitamina D (Dusso et al., 2005; Shimada et al., 2004).

### **2.1.3 Ações da vitamina D no metabolismo mineral**

A maior parte do que se sabe sobre a vitamina D em bovinos é originado do seu papel no metabolismo do cálcio. A vitamina D está intimamente ligada ao metabolismo de Ca e P no organismo sempre tentando manter a homeostase. A absorção de elementos minerais, juntamente com o transporte, armazenamento e excreção são componentes do sistema dinâmico, que, mantém o consumo alimentar em uma escala "normal", que resultará em homeostase. A manutenção da homeostase do cálcio é regulada por três grandes fatores: a atividade óssea, a excreção urinária e a absorção intestinal.

A vaca leiteira moderna enfrenta seu maior desafio metabólico pouco antes do parto e algumas semanas depois devido às grandes demandas de cálcio da glândula mamária para fornecer leite para a prole. O animal também tem um período menos desafiador durante a gestação para fornecer cálcio para a crescente estrutura esquelética do feto (Horst, Goff e Reinhardt 1994). O Ca no sangue de uma vaca adulta é mantido em aproximadamente 8,5 a 10 mg/dL. Uma vaca em produção, produzindo colostro ou leite, além da necessidade do organismo, é excretado de 20 a 30 g de Ca por dia no leite. Para evitar que o Ca sanguíneo diminua, o que tem uma variedade de consequências severas ao organismo animal, a vaca deve substituir o Ca perdido no leite, retirando Ca do osso ou aumentando a eficiência de absorção do Ca da dieta para manter a homeostase. E isso acontece por diversos mecanismos (Goff, 2000).

Grande parte da função da vitamina D no metabolismo de Ca e P está relacionada ao  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ . A conversão de  $25(\text{OH})\text{D}$  em  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  é dependente da enzima  $1\alpha$ -hidroxilase e esta é fortemente regulada pelas ações do PTH, calcitonina e concentração de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , em resposta à concentração de cálcio e fósforo no soro (Yoshida et al., 2001; Liu et al., 2006). O calcitriol aumenta a absorção intestinal de Ca (Pansu et al., 1983), a reabsorção óssea (Kitazawa et al., 2003) e a reabsorção de Ca e P urinário (Hoenderop et al., 2005).

Além disso o  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  tem que se ligar ao sítio ativo da vitamina D (VDR) para que haja a absorção de Ca e P na luz intestinal e estes são armazenados quase em sua totalidade nos ossos e dentes por transporte ativo, que é a maior rota de absorção em ruminantes, para que possa ser mobilizado em caso de necessidade, liberando Ca e P para utilização imediata no organismo. Porém à medida que os animais envelhecem, a quantidade de sítios ativos da vitamina D com o avançar da idade reduz, ou seja animais mais velhos tem maior dificuldade em absorver e mobilizar Ca e P para utilização.

A produção da enzima  $1\alpha$ -hidroxilase é fortemente regulada pelo hormônio PTH. A secreção inadequada de PTH resulta em níveis mais baixos de  $1\alpha$ -hidroxilase e  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (Horst 1986). O hormônio da paratireoide tem 3 funções principais nas vacas: mobilizar o Ca dos ossos, promover a absorção de Ca do trato digestivo através do aumento da concentração de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  e estimular os rins a excretar o excesso de Ca e P (Goff, 2000). Além disso o PTH em conjunto com o calcitriol estimula a secreção do ativador do receptor do fator nuclear  $\kappa$ -B (RANKL) que é produzido por células ósseas, que estimulará a formação de osteoblastos e a ativação de osteoclastos em repouso para a reabsorção óssea (Macias e Hinck, 2012; Suda et al., 2003). O PTH é essencial para a

correta função óssea, regulando a atividade dos osteoblastos e osteoclastos maduros que reflete a formação e remodelação óssea. O PTH também estimula a secreção de saliva paróptica (Wright et al., 1984) e pode aumentar as concentrações de fosfato salivar de duas a três vezes.

O metabolismo do PTH é sensível aos níveis de Ca e a alterações na relação Ca/P (Mcdowell, 1992). Quando a concentração sérica de Ca está baixa, aumenta rapidamente a liberação do PTH pelas glândulas paratireóides. Altas concentrações de PTH induz o gene CYP27B1 nos rins para produzir 1- $\alpha$ -hidroxilase, a enzima que converte a 25(OH)D em 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Altas concentrações de PTH ou 1,25(OH)<sub>2</sub>D aumenta a absorção intestinal de Ca e P, atua nos rins aumentando a reabsorção tubular renal de Ca e P diminuindo a excreção urinária e quando se ligam a osteoblastos, ativa a reabsorção óssea para mobilizar Ca e P do osso aumentando o pool de Ca plasmático. Quando o Ca do sangue está dentro da faixa normal, a secreção de PTH diminui e 1,25(OH)<sub>2</sub>D é catabolizado através de um mecanismo de feedback negativo desligando o gene e impedindo a proliferação de células da paratiróide em resposta à hipocalcemia (DeLuca, 2008). Então a 25(OH)D é desviada para compostos inativos em vez de 1,25(OH)<sub>2</sub>D (Horst et al., 1994).

Caso esse feedback não funcione e ocorra altas concentrações de Ca no plasma, o que poderia causar hipercalcemia, a calcitonina é liberada pelas células C da tireóide e tem efeito oposto ao PTH (DeLuca, 2008). A calcitonina completa o ciclo de feedback, mantendo o nível adequado de Ca, interrompendo a mobilização de Ca e a reabsorção de Ca e P nos rins e estimula a deposição nos ossos e excreção urinária de Ca e P (DeLuca, 2004). Assim, uma concentração adequada de Ca no plasma inibirá a produção de 1,25(OH)<sub>2</sub>D, resultando na incapacidade de aumentar a absorção ativa de P.

Nas células endoteliais do intestino, a 1,25(OH)<sub>2</sub>D estimula a absorção ativa de cálcio no duodeno e absorção passiva no jejuno. A absorção ativa é regulada pelo estímulo à produção de proteínas responsáveis pela captação de cálcio pelos enterócitos, proteínas envolvidas no transporte intracelular do cálcio e pelos canais de membrana dependentes da saída de cálcio para o fluido extracelular. Na absorção passiva que ocorre no jejuno, a 1,25(OH)<sub>2</sub>D estimula a expressão de proteínas intercelulares que formam canais por onde o cálcio é transferido passivamente por gradiente de concentração (Hoenderop et al., 2005).

Além do intestino, nos rins, a 1,25(OH)<sub>2</sub>D atua nos túbulos distais promovendo a reabsorção do cálcio filtrado, através da regulação da expressão de proteínas

transportadoras de cálcio, porém em vacas leiteiras a quantidade de cálcio reabsorvido da urina é baixa (Goff, 2000).

Ainda ocorre interrelação entre os minerais, magnésio (Mg) e P que desempenham um papel importante na homeostase do Ca e são particularmente importantes para a sensibilidade dos tecidos aos hormônios calcitonina e ao hormônio da paratireoide (PTH). Alterações no sangue nas concentrações de Mg afetam a liberação de PTH, embora em casos mais graves de deficiência de Mg a secreção de PTH possa ser inibida e a sensibilidade do PTH reduzida nos tecidos-alvo (Rude et al., 1978; Rude, 1998). Absorção intestinal e excreção renal de Ca e Mg são interdependentes. A ingestão excessiva de P, acima de 80g/d, pode causar problemas no metabolismo do cálcio, induzindo à excessiva reabsorção óssea, formação de cálculos urinários e a “febre do leite”, pois o excesso de P diminui a absorção de cálcio no intestino, por bloquear a produção de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  nos rins (Barton et al., 1978; NRC, 2001).

O  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  em conjunto com PTH aumenta a absorção de Ca pelo intestino e estimula a reabsorção de Ca e P dos ossos pela ativação dos osteoclastos maduros que secretam osteocalcina e favorecem a desmineralização óssea, aumentando o nível de Ca e P no sangue (Horst et al., 1994; Goff, 1991; Mcdowell, 1992). O processo de reabsorção e deposição óssea no organismo é dinâmico, porém equilibrado, procurando manter a homeostase. O tempo de ressecção e formação óssea são atualmente desconhecidas na vaca leiteira, mas vários marcadores sanguíneos do metabolismo ósseo estão disponíveis, permitindo que a formação e reabsorção ósseas sejam monitoradas de forma não invasiva. No entanto, esses marcadores ainda precisam ser validados em vacas leiteiras com amostras ósseas e balanço mineral.

#### **2.1.4 Outras ações da vitamina D**

Como visto anteriormente, a vitamina D sofre hidroxilações até a formação de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ . Este composto se liga ao sitio ativo da vitamina D (VDR), permitindo sua ação. O receptor de vitamina D ativado regula a expressão de genes que contêm elementos de resposta funcional de vitamina D em seus promotores (Wang et al., 2004), mas também outros genes que são dependentes da ligação ao VDR e não relacionados a vitamina D (Kemmis et al., 2006). Estima-se que mais de 1.000 genes sejam regulados por  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (Wang et al., 2004), e o receptor da vitamina D está presente na maioria dos tecidos e tipos de células (Lin e White, 2004).

A descoberta recente desses receptores em várias células espalhadas em todo o corpo, e não relacionada a homeostase do cálcio, criou discussão sobre outras possíveis atuações da vitamina D, além da já conhecida e amplamente estudada em influenciar o metabolismo de cálcio. O papel secundário, e não menos importante, mais estudado em ruminantes e humanos da vitamina D está ligado à imunidade. Há mais de 30 anos já tem sido descrito que a vitamina D está envolvida com a função imunológica (Reinhardt e Hustmyer; 1987).

Com o avançar das pesquisas, começaram a relacionar a vitamina D à ocorrência de determinadas doenças e à relação com o sistema imune do animal. Goff (2008) sugeriu que doenças infecciosas, como por exemplo a mastite, possam ser reduzidas pela manutenção de níveis adequados de vitamina D no organismo, já que a entrada do hormônio da vitamina D para dentro da célula faz a sinalização através de receptores, para atrair células de defesa para que atuem no local da infecção. Pesquisas já mostraram que a vitamina D é extremamente importante na sinalização do sistema imune bovino (Nelson et al., 2010a; Lippolis et al., 2011).

Já se sabe que  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  regula a imunidade inata e adaptativa em bovinos (Nelson et al., 2010b; Nelson et al., 2011), em síntese, a imunidade inata, é a primeira linha de defesa do organismo, é uma resposta rápida e não específica. A imunidade adaptativa é ativada pelo contato com o agente infeccioso, e a resposta é aumentada cada vez que é exposto ao invasor. A resposta a essa infecção é mediada por anticorpos.

Segundo Nelson et al. (2012), alvos de sinalização de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  no sistema imune inato bovino são um pouco diferentes do que em humanos, mas os efeitos da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  na imunidade adaptativa são bem semelhantes entre bovinos, humanos e camundongos. Em bovinos as respostas imunes dependentes de vitamina D são controladas através de mecanismos de sinalização de vitamina D autócrina e parácrina (Nelson et al., 2011). Na sinalização autócrina, a célula responde à substâncias liberadas por ela mesma. As moléculas sinalizadoras são os mediadores locais. Na sinalização parácrina, as moléculas sinalizadoras ou também conhecidas como mediadores locais, agem em múltiplas células-alvo, próximas ao local de sua síntese.

Em experimento com bovinos, foi demonstrado o significado fisiológico da sinalização da vitamina D na defesa do hospedeiro. Bovinos leiteiros com mastite bacteriana experimentalmente induzida com *Streptococcus uberis*, foram tratados por via intramamária com 100  $\mu\text{g}$  de  $25(\text{OH})\text{D}_3$  ou placebo diariamente por 10 dias. As vacas que receberam  $25(\text{OH})\text{D}_3$  tiveram contagens bacterianas significativamente menores, número



reduzido de leucócitos nas secreções mamárias de glândulas infectadas e temperaturas corporais mais baixas do que vacas controle, demonstrando que 25(OH)D<sub>3</sub> pode limitar a severidade da mastite induzida por bactérias. No soro, nenhuma alteração foi observada de 25(OH)D ou 1,25(OH)<sub>2</sub>D, sugerindo que o sistema endócrino não teve um papel nos efeitos da 25(OH)D<sub>3</sub> na infecção. Como já foi demonstrado que a via de sinalização da vitamina D está presente nas glândulas mamárias durante mastite (Nelson et al., 2010a), logo o 25(OH)D<sub>3</sub> pode ter atuado diretamente através do VDR na glândula mamária infectada. Dados sugerem que a 25(OH)D<sub>3</sub> foi provavelmente convertida em 1,25(OH)<sub>2</sub>D para induzir os efeitos observados. Embora o tratamento com 25(OH)D<sub>3</sub> não tenha eliminado a infecção, foi demonstrado um efeito benéfico significativo da via de sinalização da vitamina D no sistema imune inato. Esse caminho pode ser explorado para melhorar a defesa da vaca contra a infecção bacteriana (Lippolis et al., 2011).

Os genes que respondem a vitamina D do sistema imune são controlados por 1,25(OH)<sub>2</sub>D produzido localmente, ou seja, não estão relacionados ao sistema endócrino (Nelson et al., 2010b). Os macrófagos possuem VDR's e são as principais fontes de 1,25(OH)<sub>2</sub>D. A enzima 1 $\alpha$ -hidroxilase regula a conversão de 25(OH)D em 1,25(OH)<sub>2</sub>D que, posteriormente, se liga ao VDR e ativa as respostas imunes mediadas por vitamina D. A 1 $\alpha$ -hidroxilase é estimulada em macrófagos bovinos através do reconhecimento do receptor Toll-like (TLR) de padrões moleculares associados a patógenos. A 1 $\alpha$ -hidroxilase é expressa no úbere durante a mastite em bovinos leiteiros (Nelson et al., 2010a). A maioria da 1 $\alpha$ -hidroxilase na glândula mamária infectada está presente como macrófagos e são secretadas no leite. Em camundongos, a 1 $\alpha$ -hidroxilase é expressa no tecido mamário durante o desenvolvimento mamário (Welsh, 2004). Células epiteliais mamárias bovinas cultivadas também expressam a 1 $\alpha$ -hidroxilase e respondem ao tratamento com 25(OH)D<sub>3</sub>.

Outro estudo demonstrou o controle local da sinalização em bovinos. A expressão do gene CYP27B1, que necessita da ligação do 1,25(OH)<sub>2</sub>D ao VDR para ser ativado, é altamente regulada no tecido mamário infectado com *Streptococcus uberis* em relação ao tecido saudável (Nelson et al., 2010a). Células componentes do sistema imune inato como Células CD14 + constituem principalmente monócitos e macrófagos, e células CD14 - constituem principalmente de neutrófilos e alguns linfócitos. O CYP27B1 é regulado positivamente nas células CD14 + nas secreções de glândulas mamárias infectadas quando comparado com as células CD14 + de glândulas saudáveis. Células CD14 - da glândula infectada não mostraram aumento da expressão do CYP27B1. A regulação

positiva de CYP27B1 está associada com o aumento da síntese de 1,25(OH)<sub>2</sub>D e ativação do VDR em glândulas mamárias infectadas. As células epiteliais mamárias podem ser outra fonte de CYP27B1 na glândula mamária, pois expressam CYP27B1 e sintetizam 1,25(OH)<sub>2</sub>D (Kemmis et al., 2006; Rowling et al., 2006). Independente disso, o aumento da expressão de CYP27B1 em glândulas mamárias infectadas fornece forte evidência *in vivo* do controle local da sinalização da vitamina D durante a resposta inata à infecção bacteriana (Nelson et al., 2010a).

Em humanos já está bem descrito que a deficiência de vitamina D deprime o sistema imunológico, assim como nível adequado de vitamina D no sangue supre alguns aspectos do sistema imunológico (Yang et al., 1993). Essas ações estão ligadas ao VDR, que necessita da vitamina D, ou melhor, do composto formado à partir da hidroxilação da vitamina D, o 1,25(OH)<sub>2</sub>D, para mediar respostas como a proliferação e diferenciação celular e imunomodulação. O VDR está presente na maioria das células imunológicas, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas, células *natural killer* e linfócitos T e B (Morri et al., 1967).

Algumas doenças autoimunes podem ser estabilizadas ou eliminadas com quantidades adequadas do hormônio da vitamina D administrado diariamente. Porém, com essa estratégia poderia ser desenvolvida a hipercalcemia, aumento nas concentrações séricas de cálcio, que vai, provavelmente, desempenhar algum papel nessa resposta terapêutica. Foi demonstrado que em ratos diabéticos e obesos, com deficiência de vitamina D, houve aumento acentuado na incidência e um menor tempo para o início da diabetes (Zella e DeLuca, 2003). Doses elevadas do hormônio da vitamina D podem impedir a destruição das células das ilhotas de Langerhans, suprimindo completamente a diabetes (Zella e DeLuca, 2003). A administração de altas doses de vitamina D também demonstrou efeito sobre lúpus sistêmico (Lemire et al., 1992), doença inflamatória intestinal e artrite reumatoide (Cantorna et al., 1998).

É provável que a supressão dessas doenças autoimunes envolva o hormônio da vitamina D, que interagem com linfócitos T reduzindo as respostas inflamatórias dos mesmos. Os mecanismos de regulação de doenças autoimunes ainda não estão completamente esclarecidos, porém com os resultados positivos para a indústria farmacêutica humana, tem-se pesquisado análogos da vitamina D para o tratamento de doenças.

Além das células imunológicas, a placenta também é capaz de sintetizar localmente a 1,25(OH)<sub>2</sub>D que têm significância para o gado leiteiro, e pode ter funções

relacionada ao feto ou à reprodução. No entanto, a função da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  na gravidez e fisiologia reprodutiva em bovinos é desconhecida. Sabe-se que a placenta produz  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  suficiente para afetar o nível plasmático. Mas já foi demonstrado em bovinos que a suplementação de vitamina D melhorou o desempenho reprodutivo em gado leiteiro (Ward et al., 1971) e que a circulação de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  é elevada durante a gravidez (O'Brien et al., 2014). Tais descobertas levam a crer que a fisiologia reprodutiva também deve ser considerada quanto ao metabolismo da vitamina D.

Também foram encontrados receptores VDR nas células das glândulas paratireoides, queratinócitos da pele, promielócitos, linfócitos, células do cólon, pituitária, células glandulares e células ovarianas (Jones et al., 1998), sugerindo que vitamina D tenha também funções local.

Os receptores VDR encontrados nas glândulas paratireoides são essenciais para o tratamento em pessoas que tenham a proliferação desta glândula anormal. A vitamina D mantém sob controle a produção do gene pré-pró paratireoidiano (Darwish e DeLuca, 1999). O hormônio da vitamina D, através de seu receptor VDR, impede a proliferação de células da glândula paratireoide, sendo está uma importante função da vitamina D. Em indivíduos normais o hormônio da vitamina D mantém o estado normal das paratireoides. Já em pacientes com insuficiência renal, o local de produção do hormônio da vitamina D é destruído e a glândula paratireoide torna-se deficiente em vitamina D. Aliada às quantidades adequadas de cálcio plasmático, a glândula paratireoide hiperprolifera e hipersecreta o paratormônio (PTH), resultando em hiperparatireoidismo secundário (Slatopolsky et al., 2003). Para o tratamento de pacientes com diálise o hormônio da vitamina D ou seus análogos já estão sendo utilizados.

Estas são as principais funções que poderiam ter ação em ruminantes e com algum papel descrito na literatura científica. Porém, em humanos, os estudos relacionados a outras funções da vitamina D, não relacionados à homeostase de cálcio e mineralização óssea, estão muito mais avançados. Já foi descrito que o nível adequado de vitamina D reduz a ocorrência de certas doenças que afetam os humanos, ou melhora o status imunitário, melhorando a sobrevivência do doente. Como por exemplo, câncer, doenças infecciosas, doenças pulmonares, doença inflamatória intestinal, doença inflamatória cutânea, diabetes, esclerose múltipla, lúpus e artrite reumatoide.

Sendo assim, verifica-se que a vitamina D tem diversas funções no organismo além da principal que é a mineralização óssea e homeostase de Ca e P. O hormônio ativo da vitamina D contribui para a fisiologia imune, reprodutiva e mamária em bovinos.

## 2.2 Técnicas de avaliação de densidade óssea

O tecido ósseo é multifuncional e metabolicamente ativo com processo dinâmico durante toda a vida de reabsorção e formação de tecido mineralizado. É remodelado principalmente para manter a homeostase de cálcio e fósforo e controlado pelos hormônios paratormônio (PTH) e calcitonina e pela ação da vitamina D local e sistêmica (Holick e Krane, 2002), como será detalhado posteriormente. Esse controle homeostático pode ser afetado pela idade, doenças osteometabólicas, mobilidade diminuída e alguns medicamentos, causando como consequências, a hiper ou hipocalcemia e osteoporose (Mundy, 1999). Os problemas causados por deficiência mineral podem ser leves ou graves, agudos ou crônicos (Holick e Krane, 2002; Suttle, 2010).

Nos ossos, a avaliação da qualidade óssea serve para acompanhamento de diversas enfermidades e pode ser feita com radiografia simples ou com uso de outras técnicas que permitam determinar a densidade mineral óssea (DMO) e o conteúdo mineral ósseo (CMO), que servem de parâmetro de normalidade e auxílio no diagnóstico de doenças osteometabólicas.

A DMO é a concentração de minerais por unidade de volume ósseo. Os minerais estão incrustados na matriz orgânica do osso fornecendo ao esqueleto a sua dureza e rigidez (Mcclure et al., 2001). Nos animais, os valores da DMO variam entre espécies, raças, gênero e idade. Cada uma dessas categorias ainda sofre alterações decorrentes da alimentação, genética, exposição ao sol e atividade. Já foram conduzidos estudos para determinação da densidade óssea em gatos (Borges et al., 2008), cães (Robson et al., 2006), suínos (Castro e Trento, 2009), ruminantes (Louzada et al., 2006; Zarrinkalam et al., 2009), equinos (Tóth et al., 2010), gansos (Charuta et al., 2014) e frangos (Oliveira et al., 2014).

Ao determinar o valor da DMO é possível diagnosticar o grau de mineralização do osso, o que pode auxiliar nos problemas ou melhorias causadas por troca de dietas, por exemplo, e na avaliação das condições nutricionais de animais (Araújo et al., 2006). Também pode auxiliar na determinação do desenvolvimento e maturidade animal, sendo que a precocidade é desejada na criação de bovinos (Vanderschueren et al., 2004). Em bovinos a mensuração de DMO e CMO é útil para prognóstico de fraturas em animais de alto valor zootécnico agregado. Em bovinos leiteiros o estudo destes parâmetros pode contribuir para o acompanhamento do metabolismo ósseo durante o pré-parto e lactação,

além de poder ser usado na avaliação de problemas ortopédicos ou alterações ósseas degenerativas.

É possível a determinação da DMO através de biópsias dos ossos e determinando o valor médio de cinzas, no caso de ruminantes, ossos da costela. Também é possível utilizar marcadores ósseos plasmáticos, como osteocalcina, PTH e telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I. Além disso alguns métodos não invasivos vêm sendo amplamente utilizados para determinar o teor de mineralização e o conteúdo mineral ósseo, como absorção direta por fótons (Cameron et al.1968), análise de ativação por nêutrons (Al-hiti et al., 1976), tomografia computadorizada (Reich et al., 1976), ultrassom (Pratt Jr., 1980) e absorciometria por raios X de dupla energia (DXA) (Tóth et al., 2010).

Entretanto, a biópsia é uma medida que está limitada a uma pequena área do osso, e pode não representar o esqueleto todo. Alterações significativas foram relatadas na densidade radiográfica que não foram detectadas nas medidas de biópsia de costela, em vacas recebendo ou não fosforo suplementar no pós-parto (Fishwick et al., 1977).

Os metabólitos sanguíneos correspondem ao metabolismo ósseo verdadeiro do animal, porém comparações entre valores obtidos por técnicas diferentes e realizados em diferentes laboratórios não são aconselhados (Kleerekoper, 2001). Sendo assim valores obtidos em estudos diferentes não devem ser comparados, especialmente para osteocalcina que sofre grande degradação dependendo do tipo de coleta e armazenamento.

A radiografia também é um dos métodos que determina a DMO. Tem um baixo custo e é a técnica mais amplamente usada. Porém tem baixa sensibilidade, só diferenciando a perda da massa óssea quando esta for superior a 30%, permitido observar somente casos severos de perda de densitometria óssea (Pun e Wong, 1991).

Densitometria radiográfica ou fotodensitometria óssea, expressa a quantidade de mineral no osso, equivalente em densidade, em milímetros de alumínio. Densitometria radiográfica é uma técnica válida para avaliação local do osso específico e correlacionado positivamente com o teor de cinzas do osso (Himes, 1978). Existem várias formas e aparelhos que possibilitam essa medição, entre elas iremos descrever a técnica de absorciometria por raios X de dupla energia (DXA) e densidade óptica em imagens radiográficas.

A técnica DXA é considerada “padrão ouro” para avaliar a densidade óssea radiográfica. A alta correlação entre valores médios de cinza e DMO indicou que a análise pela densitometria radiográfica é uma alternativa confiável (Vaccaro et al., 2012). O

princípio da técnica envolve um conjunto de medidas ponto a ponto da atenuação dos feixes de raios X que passam através do corpo do paciente em materiais que contém hidroxiapatita e tecidos moles adjacentes. O resultado da DMO é a aquisição média da DMO por área. Por fim, a DMO é multiplicada pela área óssea para obtenção do conteúdo mineral ósseo (Carstanjen et al., 2003). A técnica da DXA já foi utilizada para roedores, gatos, coelhos, cães, porcos, primatas não-humanos, ovelhas e cavalos (Grier, 1996), entre outras espécies. Nos grandes animais, a maioria das pesquisas são com equinos (Donabedian et al., 2005; Tóth et al., 2010). Uma dificuldade no emprego desta metodologia a campo seria o alto custo do aparelho e necessidade de imobilização e sedação do animal.

Por isso, a técnica de densidade óptica em imagens radiográficas, utilizando a setorização das curvas características e a correção do efeito não uniforme da radiação X (Lousada, 1994), através de uma escala de alumínio por exemplo, consegue-se observar a desmineralização óssea à partir de 12% nos ossos. Para isso utiliza-se sistemas de análises digitais que são 20 vezes mais precisos que o olho humano. Assim, a densitometria radiográfica, por meio de raio X, por ser mais barata e de simples execução é mais frequente na medicina veterinária (Louzada et al., 1994; Coates et al., 2015).

Williams et al. (1991) determinaram o conteúdo mineral ósseo no terceiro metacárpico de novilhas Angus alimentadas com dietas em níveis adequado e baixo de fósforo. O experimento avaliou a capacidade dos métodos de DXA, fotometria radiográfica e ultrassonografia na determinação da densitometria óssea. Os autores concluíram que, mesmo com valores de CV diferentes para cada uma das técnicas, todas as três técnicas avaliadas foram consideradas úteis para prognosticar o conteúdo mineral ósseo nesses animais.

A análise radiográfica de ossos mandibulares e dentes pode ser utilizada como elemento diagnóstico do hiperparatiroidismo secundário nutricional em bovinos. O uso desta técnica serve de subsídio relevante para avaliação clínica de animais que desenvolvem este tipo de problema, em consequência dos desequilíbrios dos elementos minerais constituintes de dietas para animais de interesse pecuário, além de servirem como indicadores clínicos importantes para o diagnóstico desta enfermidade (Leite et al., 2004). Na medicina veterinária a determinação da densidade óssea e do conteúdo mineral ósseo ajuda no diagnóstico de doenças osteometabólicas, na prevenção e tratamento de fraturas, no monitoramento da densidade óssea em resposta a alguma enfermidade, mudança de dietas entre outros usos. Porém o uso desta técnica ainda é bastante limitado

na medicina veterinária devido ao custo e dificuldades de levar o equipamento à campo. Além disso há necessidade de determinar valores de referência para animais, para que seu uso seja popularizado e o exame de densitometria óssea seja aplicado na prática clínica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-hiti, K., Thomas, B. J., Al-tikrity, S. A., Ettinger, K. V., Fremlin, J. H., Dabek, J. T. Spinal calcium: Its in vivo measurement in man. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*, 27:27-97, 1976.

Araújo, C. S. S., Artoni, S. M. B., Araújo, L. F., Junqueira, O. M., Louzada, M. J. Q., Oliveira, D. Densidade óssea de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de aminoácidos e cálcio durante a fase final de criação. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 28:203-208, 2006.

Armbrecht, H., Hodam, T., Boltz, M., Partridge, N., Brown, A., Kumar, V.. Induction of the vitamin D 24-hydroxylase (CYP24) by 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is regulated by parathyroid hormone in UMR106 osteoblastic cells 1. *Journal of Endocrinology*, 139: 3375-3381, 1998.

Barton, B. A., Studies of vitamin D, calcium, and phosphorus metabolism of the dairy cow. Master's Thesis, University of Wisconsin, 1978.

Beckman, M., Horst, R., Beitz, D., Reinhardt, T. Evidence for up-regulation of the 1, 25-dihydroxyvitamin D receptor (VDR) during hypervitaminosis D: a comparison between vitamin D<sub>3</sub> and vitamin D<sub>2</sub>. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology (USA)*, 1989.

Bergadà, L., Pallares, J., Arcidiacono, M. V., Cardus, A., Santacana, M., Valls, J., Cao, G., Fernández, E., Dolcet, X., Dusso, A. S. Role of local bioactivation of vitamin D by CYP27A1 and CYP2R1 in the control of cell growth in normal endometrium and endometrial carcinoma. *Laboratory Investigation*, 94: 608-622, 2014.

Bikle, D. D. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chemistry and Biology*. 21:319–329, 2014.

Borges, N. C., Vasconcellos, R. S., Canola, J. C., Paula, F. J. A., Carciofi, A. C., Pereira, G. T. Precisão da técnica de absorciometria de raios-x de dupla energia na determinação da composição corporal em gatos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60:263-266, 2008.

Cameron, J. R., Mazess, R. B., Sorenson, J. A. Precision and accuracy of bone mineral determination by direct photon absorptiometry. *Investigative radiology*, 3:141-150, 1968.

Cantorna, M. T., Hayes, C. E., DeLuca, H. F. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> prevents and ameliorates symptoms in two experimental model of human arthritis. *Journal of Nutrition*, 128:68-72, 1998.

Carstanjen, B., Duboeuf, F., Detilleux, J., Lepage, O. M. Equine Third Metacarpal Bone Assessment by Quantitative Ultrasound and Dual Energy X-Ray Absorptiometry: An Ex vivo Study. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 50:42-47, 2003.

Castro, A. L., Trento, C. L. Densitometria óssea em mandíbula de suínos submetidos a enxerto ósseo autógeno e homólogo. *Revista dental press de periodontia e implantologia*, 3:78-85, 2009.



Charuta, A., Tatara, M. R., Gruzewska, A., Pierzchala, M., Kalinowski, L., Trusewicz, M., Łuszczewska-sierakowska, I. Morphological and densitometric research of the tibial bone in the post-natal development in domestic geese. *Animal Science Papers and Reports*, 32:251-260, 2014.

Clemens, T. L., Actams, J. S., Nolan, J. M., Holick, M. F. Measurement of circulating vitamin D in man. *Clinica Chimica Acta*, 121: 301-308, 1982.

Coates, D. B., Dixon, R. M., Mayer, R. J., Murray, R. M. Validation of single photon absorptiometry for on-farm measurement of density and mineral content of tail bone in cattle. *Animal Production Science*, 56:2054-2059, 2015.

Darwish, H. M., DeLuca, H. F. Identification of a transcription factor that binds to the promoter region of the human parathyroid hormone gene. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 365:123–130, 1999.

DeLuca, H. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80: 1689-1696, 2004.

DeLuca, H. Evolution of our understanding of vitamin D. *Nutr Rev*, 66: 73-87, 2008.

DeLuca, H. Vitamin D metabolism. *Clinical endocrinology*, 7, 1977.

Donabedian, M., Delguste, C., Perona, G., Lebecque, P., Duboeuf, F., Lepage, O., Martinrosset, W. Third metacarpal bone mineral density assessment in the standing horse by dual X-ray Absorptiometry Suitability, precision and accuracy. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 18:26-30, 2005.

Dusso, A. S., Brown, A. J., Slatopolsky, E. Vitamin D. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*. 289:8–28, 2005.

Engstrom, G. W., Horst, R. L., Reinhardt, T. A., Littledike, E. T. 25-Hydroxyvitamin D 1 alpha- and 24-hydroxylase activities in pig kidney homogenates: effect of vitamin D deficiency. *Journal of Nutrition*, 114: 119-26, 1984.

Fishwick, G., Fraser, J., Hemingway, R. G., Parkins, J. J. The effects of dietary phosphorus inadequacy during pregnancy and lactation on the voluntary intake and digestibility of oat straw by beef cows and the performance of their calves. *Journal of Agricultural Science*, 88:143-150, 1977.

Fraser, D. R., Kodicek, E. Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature*, 228: 764-766, 1970.

Galvão, L. O., Galvão, M. F., Reis, C. M. S., Batista, C. M. A., Casulari, L. A. Considerações atuais sobre a vitamina D. *Brasilia Médica*, 50:324-332, 2013.

Goff, J. P. Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders. *Metabolic disorders of ruminants. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16:319–337, 2000.

- Goff, J. P. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Veterinary Journal*, 176:50-57, 2008.
- Goff, J. P., Horst, R. L., Mueller, F. J., Miller, J. K., Kiess, G. A., Dowlen, H. H. Addition of chloride to a prepartal diet high in cations increases 1,25-dihydroxy vitamin D response to hypocalcemia preventing milk fever. *Journal of Dairy Science*, 74:3863–3871, 1991.
- Goff, J. P., Horst, R. L., Reinhardt, T. A. The pathophysiology and prevention of milk fever. *Vet Med* 82:943, 1987.
- Grier, S. J., Turner, A. S., Alvis, M. R. The use of dual-energy x-ray absorptiometry in animals. *Investigative radiology*, 31:50-62, 1996.
- Hagenau, T., Vest, R., Gissel, T. N., Poulsen, C. S., Erlandsen, M., Mosekilde, L. Global vitamin D levels in relation to age, gender, skin pigmentation and latitude: an ecologic meta-regression analysis. *Osteoporos Int.* 20:133-140, 2009.
- Heaney, R. P., Armas, L. A., Shary, J. R., Bell, N. H., Binkley, N., Hollis, B. W. 25-Hydroxylation of vitamin D<sub>3</sub>: relation to circulating vitamin D<sub>3</sub> under various input conditions. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87: 1738-1742, 2008.
- Himes, J. H. Bone growth and development in protein-calorie malnutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 28:143-187, 1978.
- Hoenderop, J. G., Nilius, B., Bindels, R. J. Calcium absorption across epithelia. *Physiological Reviews*, 85:373-422, 2005.
- Holick, M. F. The vitamin D deficiency pandemic and consequences for nonskeletal health: mechanisms of action. *Molecular Aspects of Medicine*, 29(6):361-368, 2008.
- Holick M. F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *Journal Clinical Investigation*, 116(8):2062-2072, 2006.
- Holick, M. F., Krane, S. M. Introdução ao metabolismo ósseo e mineral. In: Braunwald, E, Fauci, A. S., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L., editores. *Harrisson Medicina Interna*. 15a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2002. p. 2329-2343.
- Horst, R. L. Regulation of calcium and phosphorus homeostasis in the dairy cow. *Journal Dairy Science*, 69: 604-616, 1986.
- Horst, R. L. Studies on vitamin D and calcium metabolism in the parturient dairy cow and the rat. Doctoral Thesis, University of Wisconsin, 1976.
- Horst, R. L., Littledike, E. T., Riley, J. L., Napoli, J. L. Quantitation of vitamin D and its metabolites and their plasma concentrations in five species of animals. *Analytical Biochemistry*, 116: 189-203, 1981.
- Horst, R. L., Goff, J. P., Reinhardt, T. A. Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. *Journal of Dairy Science*, 77:1936-1951, 1994.

- Horst, R. L., Reinhardt, T. A., Reddy, G. S. Vitamin D metabolism. *Vitamin D*, 1: 15-36, 2005.
- Jones, G., Prosser, D. E., Kaufmann, M. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): its important role in the degradation of vitamin D. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 523: 9-18, 2012.
- Jones, G., Strugnell, S. A., DeLuca, H. F. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiological Reviews*, 78:1193–1231, 1998.
- Kemmis, C. M., Salvador, S. M., Smith, K. M., Welsh, J. Human mammary epithelial cells express CYP27B1 and are growth inhibited by 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, the major circulating form of vitamin D-3. *Journal of Nutrition*, 136:887–892, 2006.
- Kitazawa, S., Kondo, T., Kitazawa, R. Vitamin D<sub>3</sub> supports osteoclastogenesis via functional vitamin D response elements of human RANKL gene promoter. *J. Cell. Biochem.* 89:771–777, 2003.
- Kleerekoper, M. Biochemical markers of bone turnover: why theory, research, and clinical practice are still in conflict. *Clinical Chemistry*, 47(8):1347-1349, 2001.
- Kolek, O. I., Hines, E. R., Jones, M. D., LeSueur, L. K., Lipko, M. A., Kiela, P. R., Collins, J. F., Haussler, M. R., Ghishan, F. K. 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> upregulates FGF23 gene expression in bone: the final link in a renal-gastrointestinal-skeletal axis that controls phosphate transport. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289: 1036-1042, 2005.
- Larkins, R., Colston, K., Galante, L., MacAuley, S., Evans, I. A., MacIntyre, I. Regulation of vitamin-D metabolism without parathyroid hormone. *The Lancet*, 302: 289-291, 1973.
- Leite, J. E. B., Maia, F. C. L., Soares, P. C., Santos, R. M. B., Nunes, V. A., Muniz, L. M. R. Aspectos radiográficos da mandíbula e crista interdentária de bovinos induzidos ao hiperparatiroidismo secundário nutricional. *Revista Brasileira de Ciência e Veterinária*, 11:16-20, 2004.
- Lemire, J. M., Ince, A., Takashima, M. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/1 mice. *Autoimmunity*, 12:143–148, 1992.
- Lindgren, U, DeLuca, H. F. Role of Parathyroid Hormone and 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in the Development of Osteopenia in Oophorectomized. Rats. *Calcified Tissue International*, 34:510-514, 1982.
- Lippolis, J. D., Reinhardt, T. A., Sacco, R. A., Nonnecke, B. J., Nelson, C. D. Treatment of an intramammary bacterial infection with 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Plos One*, 3, 2011, doi:10.1371/journal.pone.0025479.
- Liu, P. T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B. H., Krutzik, S. R., Ochoa, M. T., Schaubert, J., Wu, K., Meinken, C., Kamen, D. L., Wagner, M., Bals, R., Steinmeyer, A.,

Zugel, U., Gallo, R. L., Eisenberg, D., Hewison, M., Hollis, B. W., Adams, J. S., Bloom, B. R., Modlin, R. L. Toll-like receptor triggering of a vitamin D mediated human antimicrobial response. *Science*, 311:1770–1773, 2006.

Louzada, M. J. Q. Otimização da técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas de peças óssea. Estudo in vitro. 1994. 129f. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) – Faculdade de Engenharia Elétrica, Universidade de Campinas, Campinas, 1994.

Louzada, M. J. Q., Belangero, W. D., Martins, L. E. B. Avaliação de parâmetros biomecânicos pela densitometria radiográfica. Estudo “in vitro” em osso cortical de tíbias de carneiros. *Brazilian Journal of Biomechanics = Revista Brasileira de Biomecânica*, 7(12):33-38, 2006.

Macias, H., Hinck, L. Mammary gland development. *Wiley Interdiscip. Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1:533–557, 2012.

MacLaughlin, J. A., Anderson, R. R., Holick, M. F. Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D<sub>3</sub> and its photoisomers in human skin. *Science* 216:1001–1003, 1982.

Mcclure, S. R., Watkins, J. P., Ashman, R. B. In vitro evaluation of intramedullary interlocking nail fixation of transverse femoral osteotomies in foals. *Veterinary Surgery*, 27:29-36, 1998.

Mcdowell, R. L. Minerals in animal and human nutrition. San Diego: Academic Press, 1992, p.524.

Morri, H., Lund, J., Neville, P. F., DeLuca, H. F. Biological activity of a vitamin D metabolite. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 120:508–512, 1967.

Mundy, G. R. Bone remodeling. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 4th ed. Lippincott Williams e Wilkins. Philadelphia, p.30-38, 1999.

Nelson, C. D., Lippolis, J. D., Reinhardt, T. A., Sacco, R. E., Powell, J. L., Drewnoski, M. E., O’Neil, M., Beitz, D. C., Weiss, W. P. Vitamin D status of dairy cattle: Outcomes of current practices in the dairy industry. *Journal of Dairy Science*, 99: 10150-10160, 2016.

Nelson, C. D., Merriman, K. E. Vitamin D metabolism in dairy cattle and implications for dietary requirements. In ‘25th annual Florida ruminant nutrition symposium’, Gainesville, FL. (University of Florida IFAS Extension), 2014.

Nelson, C. D., Nonnecke, B. J., Reinhardt, T. A., Waters, W. R., Beitz, D. C., Lippolis, J. D. Regulation of Mycobacterium-specific mononuclear cell responses by 25 hydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Plos One*, 6(6), 2011. doi:10.1371/journal.pone.0021674.

Nelson, C. D., Reinhardt, T. A., Beitz, D. C., Lippolis, J. D. In vivo activation of the intracrine vitamin D pathway in innate immune cells and mammary tissue during a bacterial infection. *Plos One*, 5, 2010a, doi:10.1371/journal.pone.0015469.

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*, 4:181-196, 2012.

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 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in bovine monocytes. *Journal Dairy Science*, 93:1041–1049, 2010b,

NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

O'Brien, K. O., Li, S., Cao, C., Kent, T., Queenan, B. V., Pressman, E. K., Cooper, E. M. Placental CYP27B1 and CYP24A1 expression in human placental tissue and their association with maternal and neonatal calcitropic hormones. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(4):1348-1356, 2014.

Oliveira, A. F. G., Bruno, L. D. G., Martins, E. N., De Moraes, E. R. G., Monteiro, A. C., De Paula, M. C. L., Sangali, C. P. Efeito da densidade de criação e do grupo genético sobre a composição mineral e desenvolvimento de ossos longos de frangos de corte. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(2):1023- 1034, 2014.

Omdahl, J., Swamy, N., Serda, R., Annalora, A., Berne, M., Rayb, R. Affinity labeling of rat cytochrome P450C24 (CYP24) and identification of Ser57 as an active site residue. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 89: 159-162, 2004.

Pansu, D., Bellaton, C., Roche, C., Bronner, F. Duodenal and ileal calcium absorption in the rat and effects of vitamin D. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 244: 695-700, 1983.

Perwad, F., Zhang, M. Y., Tenenhouse, H. S., Portale, A. A. Fibroblast growth factor 23 impairs phosphorus and vitamin D metabolism in vivo and suppresses 25-hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -hydroxylase expression in vitro. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 293: 1577-1583, 2007.

Pratt Jr., G. W. An in vivo method of ultrasonically evaluating bone strength. In: *Proceedings Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 13:26-29, 1980.

Pun, K. K., Wong, F. H. W. Importance of bone densitometry in clinical practice. *Journal of the Western Pacific Orthopaedic Association*, 28:23-31, 1991

Reich, N. E., Seidelmann, F. E., Tubbs, R. R., Mac intyre, W. J., Meaney, T. F., Alfidi, R. J., Pepe, R. G. Determination of bone mineral content using CT scanning. *American Journal of Roentgenology*, 127(4):593, 1976.

Reinhardt, T. A., Horts, R. L. Parathyroid hormone down-regulates 1,25-dihydroxyvitamin D receptors (VDR) and VDR messenger ribonucleic acid in vitro and blocks homologous up-regulation of VDR in vivo. *Journal of Endocrinology*, 127: 942-948, 1990.

Reinhardt, T. A., Hustmyer, F. G. Role of vitamin D in the immune system. *Journal Dairy Science*, 70:952-962, 1987.

Robson, G. F., Balieiro, J. C. C., Serman, F. A., Fonseca, A. C. B. C., Miglino, M. A., Zatz, M., Auada, C. R. F. Estudo longitudinal da densidade mineral óssea em cães jovens da raça Golden Retriever: Correlações com idade e peso corpóreo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 43(5):681-687, 2006.

Rodney, R., Martinez, N., Block, E., Fernandez, L. L., Nelson, C. D., Celli, P., Santos, J. E. P., Lean, I. J. Effects of prepartum dietary cation-anion difference and source of vitamin D on dairy cows: Vitamin D, mineral and bone metabolism. *Journal of Dairy Science*, 101(3):2519-2543, 2018.

Rowling, M. J., Kemmis, C. M., Taffany, D. A., Welsh, J. Megalin-mediated endocytosis of vitamin D binding protein correlates with 25-hydroxycholecalciferol actions in human mammary cells. *Journal Nutrition*, 136:2754–2759, 2006,

Rude, R. K. Magnesium deficiency: A cause of heterogeneous disease in humans. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13:749-758, 1998.

Rude, R. K., Oldham, S. B., Sharp Jr., C. F., Singer, F. R. Parathyroid hormone secretion in magnesium deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 47(4):800-806, 1978.

Selby, P. L., Davles, M., Marksm, J. S., Mawer. E. B. Vitamin D intoxication causes hypercalcaemia by increased bone resorption which responds to pamidronate. *Clinical Endocrinology*, 43:531-536, 1995.

Shimada, Y., Wiget, P., Gulli, M. P., Bi, E., Peter, M. The nucleotide exchange factor Cdc24p may be regulated by auto-inhibition. *The EMBO Journal*, 23(5):1051-1062, 2004.

Shinki, T., Jin, C. H., Nishimura, A., Nagai, Y., Ohyama, Y., Noshiro, M., Okuda, K., Suda, T. Parathyroid hormone inhibits 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-24-hydroxylase mRNA expression stimulated by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in rat kidney but not in intestine. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 13757-13762, 1992.

Slatopolsky, E., Gonzalez, E., Martin, K. Pathogenesis and treatment of renal osteodystrophy. *Blood Purification*, 21:318–326, 2003.

Sommerfeldt, J. L., Napoli, J. L., Littledike, E. T., Beitz, D. C., Horst, R. L. Metabolism of orally administered [3H]ergocalciferol and [3H]cholecalciferol by dairy calves. *Journal of Nutrition*, 113: 2595-2600, 1983.

Stryer L (1995) *Biochemistry* (4th ed.). New York: W. H. Freeman and Company.

- Suda, T., Ueno, Y., Fujii, K., Shinki, T. Vitamin D and bone. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88: 259-266, 2003.
- Suttle, N. F. Mineral nutrition of livestock. 4<sup>a</sup> ed. Cabi Publishing, New York, 2010. 587 p.
- Tóth, P., Horváth, C., Ferencz, V., Nagy, K., Gligor, N., Szenci, O., Bodó, G. Assessment of the mineral density and mineral content of the equine third metacarpal and first phalanx bone by dual energy x-ray absorptiometry. *Acta Veterinaria Hungarica*, 58(3):317-329, 2010.
- Vaccaro, C., Busetto, R., Bernandini, D., Anselmi, C., Zotti, A. Accuracy and precision of computer-assisted analysis of bone density via conventional and digital radiography in relation to dual-energy x-ray absorptiometry. *American journal of veterinary research*, 73(3):381-384, 2012.
- Vanderschueren, D., Vandenput, L., Boonen, S., Lindberg, M. K., Bouillon, R., Ohlsson, C. Androgens and bone. *Endocrine reviews*, 25(3):389-425, 2004.
- Wallis, G. C., Kennedy, G. H., Fishman, R. H. The vitamin D content of roughages. *Journal of Animal Science*, 17: 410-415, 1958.
- Wang, T. T., Nestel, F. P., Bourdeau, V., Naga, I. Y., Wang, Q., Liao, J., Tavera-Mendoza, L., Lin, R., Hanrahan, J. W., Mader, S., White, J. H. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *Journal of Immunology*, 173: 2909-2912, 2004.
- Ward, G., Marion, G. B., Campbell, C. W., Dunham, J. R. Influences of calcium intake and vitamin D supplementation on reproductive performance of dairy cows. *Journal Dairy Science*, 54:204-206, 1971.
- Weiss, W. P., Azem, E., Steinberg, W., Reinhardt, T. Effect of feeding 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> with a negative cation-anion difference diet on calcium and vitamin D status of periparturient cows and their calves. *Journal Dairy Science*, 98: 5588-5600, 2015.
- Welsh, J. Vitamin D and breast cancer: insights from animal models. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80:1721-1724, 2004.
- Williams, S. N., Mcdowell, L. R., Lawrence, L. A., Wilkinson, N. S., Ferguson, P. W., Warnick, A. C. Criteria to evaluate bone mineralization in cattle: II. Noninvasive techniques. *Journal of Animal Science*, 69(3):1243-1254, 1991.
- Wright, R. D., Blair-West, J. R., Weisn, J. F., Tregear, G. W., Rosenblatt, M. Evaluation of the biological properties of parathyroid hormone and analogues in a vascularly isolated parotid gland-based assay. *Journal of Endocrinology*, 102(3):375-379, 1984.

Yang, S., Smith, C., Prah, J. M., DeLuca, H. F. Vitamin D deficiency suppresses cell-mediated immunity in vivo. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303:98–106, 1993.

Yang, W., Hyllner, S. J., Christakos, S. Interrelationship between signal transduction pathways and 1, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in UMR106 osteoblastic cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 281: 162-170. 2001.

Yoshida, T., Yoshida, N., Monkawa, T., Hayashu, M., Saruta, T. Dietary phosphorus deprivation induces 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1alpha-hydroxylase gene expression. *Endocrinology*, 142:1720–1726, 2001.

Zarrinkalam, M. R., Beard, H., Schultz, C. G., Moore, R. J. Validation of the sheep as a large animal model for the study of vertebral osteoporosis. *European Spine Journal*, 18(2):244-253, 2009.

Zella, J. B., DeLuca, H. F. Vitamin D and autoimmune diabetes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88:216-237, 2003.



## **SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**

**O artigo 1 foi formatado de acordo com as normas para submissão ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira**

**O artigo 2 foi formatado de acordo com as normas para submissão ao periódico Journal of Dairy Science**

**(VERSÕES PRELIMINARES)**

## ARTIGO 1

### Técnica de medição da densidade mineral óssea em vacas leiteiras a partir da densitometria óptica em radiografias digitais

Izabella Carolina de Oliveira Ribeiro\*, Rayana Brito Silva†, Lucas Carneiro de Resende\*, Leticia do Nascimento Resende\*, Antônio Carlos Cunha Lacrete Júnior\* and Marcos Neves Pereira\*†

\*Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG 37200-000, Brazil

†Better Nature Research Center, Ijaci, MG 37205-000, Brazil

#### RESUMO

Em bovinos a análise de densitometria óptica radiográfica tem sido muito pouco utilizada. Com a padronização da técnica e facilidade de utilização da ferramenta e obtenção do dado, esta técnica pode ser utilizada para avaliar o metabolismo ósseo da vaca leiteira. Com isto, objetivou-se padronizar a técnica de densitometria óptica radiográfica e valores da densidade mineral em bovinos leiteiros e correlacionar os valores com idade, peso e marcadores séricos (Ca total, Ca ionizado, P, Mg, osteocalcina, fosfatase alcalina do osso e telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX-1)). Foram avaliadas trinta vacas holandesas ( $230 \pm 137$  DEL, 8 primíparas) produção de leite  $31,3 \pm 6,3$  kg/d, ingestão de matéria seca  $23,0 \pm 3,8$  kg/d e peso  $666 \pm 83$  kg. Foi avaliado no primeiro dia (d 0) e após 84 dias (d 84), a densidade mineral óssea, peso corporal, idade e concentrações séricas de Ca ionizado, Ca total, P, Mg. Os parâmetros sanguíneos osteocalcina, fosfatase alcalina óssea e CTX-1 foram avaliados somente no dia 84, com intuito de verificar a correlação entre os parâmetros. A densidade mineral óssea (DMO) é maior com o avançar da idade das vacas, apresentando resultado significativos para três regiões de avaliação. Animais com maior idade aumentaram peso (681 vs 623 Kg) e reduziram fósforo (6,10 vs 6,66 mg/dL) e telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX-1) (0,32 vs 0,56 ng/mL), e tenderam a reduzir fosfatase óssea (25,31 vs 32,21 ng/mL) comparado com animais mais jovens. Com avançar do dia de lactação (DEL) a DMO das vacas leiteiras foi maior, exceto para a variável do carpo acessório. Com o avançar do DEL, o peso (670 vs 633 Kg) e as concentrações sanguíneas de cálcio total (9,38 vs 8,95 mg/dL) e cálcio ionizado (5,11 vs 4,87 mg/dL) aumentaram. Os valores médios da DMO de vacas em lactação do

34 carpo acessório, e metacarpo na região de avaliação lateral, medial e medular,  
35 apresentaram valores médios de 14,91; 27,45; 25,25 e 16,06 mmAl respectivamente. A  
36 DMO em vacas leiteiras correlacionou positivamente com cálcio total e cálcio ionizado  
37 das regiões do carpo acessório, e metacarpo córtex lateral, medial e medular. Pesos  
38 corporais das vacas apresentaram boa correlação com a DMO das radiografias do córtex  
39 lateral, medial e medular do metacarpo. A fosfatase alcalina do osso correlacionou  
40 negativamente com a DMO do metacarpo lateral. E o marcador de reabsorção óssea CTX-  
41 1 tendeu a correlacionar negativamente com todas as medidas das radiografias do córtex  
42 do metacarpo lateral e medial. Conclui-se que a DMO determinada por densitometria  
43 óptica em imagem radiográfica é uma metodologia de fácil execução, reprodutibilidade e  
44 baixo custo que pode ser empregado na avaliação da DMO em vacas leiteiras.

## INTRODUÇÃO

Ao determinar o valor da densidade mineral óssea (DMO) é possível diagnosticar o grau de mineralização do osso, o que pode auxiliar na avaliação da condição nutricional e sanidade dos animais (Araújo et al., 2006). Também pode auxiliar na determinação do desenvolvimento e maturidade animal (Vanderschueren et al., 2004). Em bovinos a mensuração de DMO e conteúdo mineral ósseo (CMO) é útil para prognóstico de fraturas em animais de alto valor zootécnico, além de auxiliar na avaliação de problemas ortopédicos ou alterações ósseas degenerativas.

A DMO é inversamente correlacionada com a idade, vários autores constataram que o animal até atingir a puberdade acumula minerais nos ossos, ou seja, vai aumentando a DMO com o avançar do seu crescimento até atingir um pico e ocorrer a estabilização, e após, com o avançar da idade animal, ocorre uma diminuição de DMO, bem similares ao que acontece em humanos (Iinui et al., 2004; Fukuda e Iida, 2004).

É possível determinar a DMO através de biópsias dos ossos determinando o valor médio de cinzas, no caso de ruminantes, nos ossos da costela. Também é possível utilizar marcadores ósseos plasmáticos, como osteocalcina e CTX-1. Porém esses dois métodos são invasivos. Outros métodos não invasivos que podem ser utilizados para determinação da DMO, são por meio da absorção direta por fótons SPA e DPA (Cameron et al. 1968), análise de ativação por nêutrons (Al-hiti et al., 1976), tomografia computadorizada (Reich et al., 1976), ultrassonografia (Pratt Jr., 1980) e absorciometria por raios X de dupla energia DEXA (Tóth et al., 2010). Porém, o alto custo dos equipamentos específicos e ocasionalmente ser necessário a sedação dos animais para avaliar a densidade mineral óssea, tem reduzido o uso deste parâmetro como forma de diagnóstico de rotina na medicina veterinária.

Assim, a densitometria óptica radiográfica (DOR) tem sido usada para determinar a DMO, que expressa relativamente a quantidade de mineral no osso, equivalente em densidade em milímetros de alumínio (Louzada, 1994). Esta técnica detecta a partir de 12% de perda de cálcio do tecido ósseo, pois utiliza a setorização de curvas e correção do efeito não uniforme da radiação-x, proposta por Louzada (1994). Já o exame radiográfico simples detecta alteração de mineralização óssea acima de 30% do seu conteúdo (Gordon et al., 1994).

A técnica DOR tem sido pesquisada e utilizada por diversas áreas da medicina veterinária por ser mais barata e de simples execução (Coates et al., 2015; Vulcano e Santos, 2003). Em grandes animais já foi avaliado a densidade mineral óssea do carpo de potros da raça Quarto de Milha e Puro Sangue Inglês (Vulcano et al., 1997; Vulcano e Santos, 2003). Em pequenos animais como cães e felinos esta técnica tem sido bastante utilizada com intuito de obter a DMO dos animais (Robson et al., 2006; Vulcano et al., 2008).

79 Entretanto em bovinos a análise de DOR tem sido muito pouco utilizada. Falta uma técnica  
80 padronizada, de fácil execução e obtenção de dados para a avaliação do metabolismo ósseo de vacas  
81 leiteiras. Com isto, objetivou-se padronizar a técnica de densitometria óptica radiográfica (DOR) e  
82 parametrizar valores de densidade mineral em bovinos leiteiros adultos, correlacionando-os com idade,  
83 peso e marcadores séricos (Ca total, Ca ionizado, P, Mg, osteocalcina, fosfatase alcalina óssea e CTX-  
84 1).

## 85 MATERIAL E MÉTODOS

86 Os animais foram alojados em instalações do tipo *tie stall* com camas individuais de areia e  
87 paredes abertas, com ventiladores e aspersores de alta pressão e tiveram acesso contínuo à pista de  
88 alimentação e bebedouro. Os animais foram avaliados no Better Nature Research Center  
89 (<http://www.holandesflamma.com.br/>). O centro de pesquisa está localizado a 846 m de altura, 21° 09  
90 '52,41" de latitude sul e 44° 55' 52,40" de longitude oeste.

91 Foram avaliadas vinte e nove vacas holandesas ( $218 \pm 131$  dias em lactação (DEL)) com  
92 produção de leite de  $31,3 \pm 6,3$  kg/d, ingestão de matéria seca  $23,0 \pm 3,8$  kg/d, peso de  $666 \pm 83$  kg,  
93 concentração de gordura no leite de  $3,39 \pm 0,6$  %, proteína de  $3,31 \pm 0,5$  %, sólidos de  $12,1 \pm 1,0$  % e  
94 CCS linear, 0 a 9 de  $2,9 \pm 1,8$ .

95 Os animais foram alimentados individualmente na forma de dieta completa sendo essa  
96 fornecida diariamente às 0700 e às 1300 h em quantidades para permitir 7 a 10% de sobras por vaca.  
97 A dieta continha silagem de milho, feno de aveia, farelo de algodão, milho maduro finamente moído,  
98 polpa cítrica, farelo de soja, farelo de soja com baixa degradabilidade ruminal (Soypass), minerais e  
99 vitaminas. As vacas foram ordenhadas 3 x/d às 0500, 1300 e 2000 h em uma ordenha do tipo espinha  
100 de peixe.

101 Foi avaliado no primeiro dia (d 0) e após 84 dias (d 84), ou seja, após 12 semanas, a densidade  
102 mineral óssea, peso corporal, idade e concentrações séricas de Ca ionizado, Ca total, P, Mg. Os  
103 parâmetros sanguíneos osteocalcina, fosfatase alcalina óssea e CTX-1 foram avaliados somente no dia  
104 84 com intuito de verificar a correlação entre os parâmetros.

105 O peso corporal (PC) foi medido após a ordenha da manhã por dois dias consecutivos em uma  
106 balança (Tru-Test). O rebanho é registrado na Associação de Criadores da Raça Holandesa, e a idade  
107 dos animais foi obtida através da consulta dos registros.

108 Nos dias 0 e 84, amostras de sangue foram obtidas dos vasos coccígeos 12 h após a alimentação  
109 matinal. Amostras de soro foram obtidas para a mensuração das concentrações de Ca total, Ca  
110 ionizado, P e Mg por espectrofotometria (AU 480. Beckman Coulter Diagnostics, Brea, EUA) em um  
111 laboratório comercial (Laboratório Santa Cecília, Lavras, Brasil) no mesmo dia que foram coletadas.

112 Este mesmo procedimento foi realizado apenas no dia 84 em amostras de soro para avaliação  
113 de osteocalcina, fosfatase alcalina óssea e CTX-1. As concentrações de osteocalcina total e fosfatase  
114 alcalina óssea foram medidas no Vet Lab (Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil). A osteocalcina foi  
115 analisada por ensaios disponíveis comercialmente (Elecsys N-MID, Roche Diagnostics, Manheim,  
116 Alemanha). A atividade da fosfatase alcalina óssea (SPIFE ALP-20; Helena Laboratories, Beaumont,  
117 EUA) foi medida usando um sistema de eletroforese automatizado (SPIFE 3000; Helena Laboratories,  
118 Beaumont, EUA). A concentração de CTX-1 foi analisada por kits comerciais (Serum crossLaps  
119 ELISA (CTX-1). Ids Ltd AC-02F1, Tyne and Wear, Reino Unido).

120 A densidade mineral óssea foi medida por densitometria óptica por imagens radiográficas do  
121 membro torácico esquerdo, em dois dias distintos, no dia 0 e 84 dias após a primeira avaliação. As  
122 radiografias foram realizadas com as vacas nas respectivas camas sem necessidade de sedação ou  
123 qualquer outro tipo de contenção. Foi utilizado um aparelho de raios-x, modelo 1060 HF (Ecoray. Seul,  
124 Coréia) para obter imagens radiográficas com técnica padronizada em 100 quilovoltagem (kVp) e 60  
125 miliamperes / segundo (mAs). As imagens radiográficas foram processadas em sistema digital direto  
126 (DDR); Wireless digital flat painel detector modelo Mars 1417V-PSI e armazenadas em arquivo  
127 DICOM para posterior avaliação. Utilizou-se um penetrômetro de alumínio (Alloy 6063) como  
128 referência de densitometria (Figura 1), composto por 29 degraus, sendo o primeiro degrau com 1,00  
129 mm de espessura e variando em 1,00 mm de um degrau ao outro, até o vigésimo nono degrau. Cada  
130 degrau tinha uma área de 5 x 15 mm. Foram realizadas duas radiografias por vaca, metacarpo e carpo  
131 acessório, resultando em quatro locais de amostragem.

132 As radiografias foram realizadas em projeções mediolateral visando a visibilização do osso  
133 carpo acessório (Figura 2) e dorsopalmar, para as mensurações da DMO no córtex lateral e medial do  
134 metacarpo, bem como da região medular (Figura 3 e 4). As medidas da DMO do córtex lateral e medial  
135 do metacarpo foram realizadas a 6 cm da superfície do osso subcondral da epífise proximal do  
136 metacarpo (Figura 3) e na região medular, a 3 cm da superfície do osso subcondral da epífise proximal  
137 do metacarpo (Figura 4). A densidade óptica das imagens radiográficas das áreas de amostragem e os  
138 degraus do penetrômetro foram medidas para cada vaca e para cada radiografia em pixels com o  
139 software de processamento de imagens Java (ImageJ. National Institutes of Health, Bethesda, EUA).  
140 As áreas de amostragem foram medidas três vezes pelo mesmo avaliador, sem experiência previa, e  
141 utilizado a média destas medidas com intuito de reduzir o erro.

142 Equações exponenciais relacionando o mmAl de cada degrau do penetrômetro e os valores de  
143 pixel de cada etapa foram desenvolvidas para cada radiografia para gerar uma medida da densidade  
144 óptica para cada região de amostragem em mmAl. O coeficiente de determinação das equações  
145 exponenciais foi de 0,9899 em média, variando de 0,9621 a 0,9982.

146 **Análise estatística**

147 Os dados de densidade mineral óssea foram apresentados de forma descritiva e as correlações  
 148 com os parâmetros sanguíneos foram analisados com o PROC CORR do SAS (versão 9.3, 2011; SAS  
 149 Institute Inc., Cary, NC). A densidade mineral óssea e os parâmetros sanguíneos foram analisadas com  
 150 o PROC MIXED do SAS, com o modelo estatístico contendo os efeitos fixos de idade (<1140 ou  
 151 >1140 dias) e DEL (0 ou 84) e interação entre idade e DEL. Vaca aninhada dentro de idade foi definido  
 152 como efeito aleatório. Para cada variável, a melhor estrutura de covariância foi definida pelos critérios  
 153 bayesianos de Schwarz entre simetria autoregressiva e composta de primeira ordem. Os dados de  
 154 osteocalcina, fosfatase óssea e telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX-1) foram  
 155 analisados com modelo contendo efeito fixo de idade. Os graus de liberdade foram calculados usando  
 156 a opção Kenward-Roger. A significância foi declarada em  $P \leq 0,05$  e as tendências em  $0,05 < P \leq$   
 157  $0,10$ .

158 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

159 A utilização da técnica de Densitometria Óptica Radiográfica (DOR) para avaliação da DMO  
 160 em vacas, utilizando imagens radiográficas DDR, com equalização dos tons de cinzas do penetrômetro,  
 161 utilizado como referência densitométrica, avaliação das regiões previamente escolhidas e baixo desvio  
 162 padrão das três avaliações realizadas em cada região, é de fácil execução e não necessita de sedação  
 163 do animal. A técnica mostrou-se então de baixo custo, precisa, sensível, reprodutível e confiável. Em  
 164 concordância estão os trabalhos de Louzada et al. (1997), Vulcano et al. (1997), Louzada et al. (1998)  
 165 e Rahal et al. (2002), e outros autores que utilizaram programas computacionais para avaliação das  
 166 imagens (Vulcano e Santos, 2003; Godoy et al., 2005; Muratomo et al., 2005; Robson et al., 2006;  
 167 Vulcano et al., 2008).

168 A densidade mineral óssea média nas faixas etárias em dias (Tabela 1) não apresentou diferença  
 169 estatística na interação DEL e faixa etária, sendo assim não há diferença para a avaliação da DMO nos  
 170 dias em lactação de vacas após o pico da lactação. A DMO é influenciada pela faixa etária das vacas,  
 171 sendo que com o avançar da idade a DMO foi maior nas três regiões de avaliação do osso metacarpo  
 172  $P \leq 0,06$ . Apenas a região do carpo acessório não teve resultados significativos estatisticamente ( $P =$   
 173  $0,90$ ).

174 Está é um achado que devemos ter cautela ao descrever, pois o esperado seria a diminuição da  
 175 DMO com o avançar da idade pensando em animais mais idosos, pois com o avançar da idade os sítios  
 176 de ligação da vitamina D vão perdendo a especificidade e conseqüentemente ocorre menor  
 177 mineralização óssea, que a longo prazo pode levar a osteoporose.

178 Nowak e Walker (1999) descreveram que uma vaca leiteira é biologicamente capaz de uma  
 179 expectativa de vida de até 20 anos, sem intervenção humana. Porém outros autores demonstram que o

180 tempo médio das vacas no rebanho atualmente varia entre 4,5 e 5,5 anos, ou 2,5 e 3,5 lactações (Wathes  
181 et al., 2008; Knaus, 2009). Esta redução da longevidade de animais leiteiros é frequentemente  
182 relacionada a intervenção humana no sistema de criação, manejo, alojamento e o grande foco na  
183 seleção genética relacionado a produção antes da década de 1980, sem ênfase na longevidade animal  
184 (Fraser, 2008; Oltenacu e Broom, 2010; Egger-Danner et al., 2015). Em especial os animais desta  
185 pesquisa não podem ser considerados animais idosos, sendo que a média de idade era  $1590 \pm 471$  dias,  
186 aproximadamente 4,4 anos de média, sendo o mínimo e máximo da idade em dias de 809 dias e 2520,  
187 respectivamente. Sendo que apenas 20% dos animais estudados nessa pesquisa com idade superior a  
188 1800 dias (5 anos). Por isso, os dados mostram um aumento da DMO com a avançar a idade de vacas  
189 leiteiras. Resultados semelhantes foram encontrados por Vulcano et al. (2008) trabalhando com  
190 espécies diferentes encontraram uma associação significativa entre DMO e a idade, onde animais com  
191 maior idade apresentavam maior DMO. Porém, estudos de Delaquerriere-Richardson et al. (1982) e  
192 Vulcano et al. (1998), encontraram resultados diferentes deste, onde a DMO não apresentou associação  
193 significativa com a idade dos animais.

194 Animais com maior idade aumentaram peso, reduziram concentrações sanguíneas de fósforo  
195 ( $P = 0,04$ ), CTX ( $P = 0,03$ ), e tenderam a reduzir fosfatase óssea ( $P = 0,07$ ). Animais mais velhos  
196 apresentam maior DMO e provavelmente maior peso devido ao maior aporte animal. Os marcadores  
197 sanguíneos ósseo CTX e fosfatase alcalina, dependem de vitamina D ou seus derivados para a correta  
198 função do metabolismo ósseo, porém sabe-se que com avançar da idade os sítios ativos da vitamina D  
199 reduz, ou seja, animais mais velhos tem maior dificuldade em absorver e mobilizar Ca e P para  
200 utilização (Goff, 2000).

201 Os resultados mostram que DEL apresentou ser altamente significativo para as medidas de  
202 DMO ( $P < 0,01$ ), excesso para a variável do carpo acessório ( $P = 0,16$ ), sendo que quanto maior o  
203 DEL maior a DMO apresentada. Isso era esperado uma vez que com o avançar da lactação, as vacas  
204 apresentam um quadro de balanço energético positivo e tendem a acumular reservas para o próximo  
205 parto. Com o avançar do DEL peso e parâmetros sanguíneos de cálcio total e de cálcio ionizado  
206 aumentaram ( $P < 0,01$ ).

207 Com relação a correlação da DMO e os demais parâmetros, utilizando os dados dos dois  
208 períodos para tomada das radiografias das vacas em lactação (dia 0 e 84) (Tabela 2 e 3) percebe-se que  
209 cálcio total e cálcio ionizado sanguíneos tem forte correlação positiva com todas as medidas de DMO  
210 ( $P \leq 0,05$ ), independentemente do local de avaliação. Em contrapartida Mg e P não apresentaram  
211 correlação ( $P \geq 0,37$ ) com a DMO.



212 O cálcio é o mineral mais abundante no organismo, representando 2% do peso vivo do corpo  
213 do animal, onde 98% destes estão nos ossos e dentes, e os outros 2% distribuídos nos fluidos extrace-  
214 lulares e tecidos moles. O Ca é armazenado quase em sua totalidade nos ossos e dentes, que pode ser  
215 mobilizado em caso de necessidade, liberando Ca e P para utilização imediata no organismo em  
216 períodos críticos de demanda aumentada (Weiller et al., 2015). Possivelmente, esta foi a razão da alta  
217 correlação da DMO com cálcio total e ionizado, sendo que o cálcio total representa o cálcio presente  
218 na forma livre e presente na reserva dos ossos, e o cálcio ionizado é a forma livre e circulante do cálcio.

219 Os pesos corporais das vacas apresentaram boa correlação com a DMO das radiografias do  
220 córtex lateral e medial do metacarpo, bem como na região medular (Tabela 3). Porém, não foi  
221 estatisticamente significativo na avaliação do carpo acessório ( $P > 0,10$ ).

222 É bem comum nos diversos estudos uma forte associação entre os valores da densidade mineral  
223 óssea e o peso corpóreo dos animais, onde animais mais pesados apresentam uma maior densidade  
224 mineral óssea, como foi observada no estudo de Stoliker et al. (1976), Delaquerriere-Richardson et al.  
225 (1982), Muramoto et al. (2005), Robson et al. (2006) e Vulcano et al. (2008), pois o esqueleto é uma  
226 estrutura peso-dependente, utilizando a osteogênese e aumento da massa óssea para adaptar-se ao peso  
227 a este conferido (Lipscomb et al., 2001).

228 Quando se utilizou somente os dados do dia 84 e conseqüentemente um número de avaliações  
229 menor quando comparado ao avaliado nos dois dias de avaliação, para correlacionar com os parâmetros  
230 sanguíneos, peso e idade (Tabela 4 e 5), a DMO de nenhuma das áreas avaliadas teve correlação  
231 significativa com idade ( $P \geq 0,26$ ) e osteocalcina ( $P \geq 0,63$ ). O peso tendeu a apresentar correlação  
232 positiva ( $P \leq 0,10$ ) com a DMO da região medular. A fosfatase alcalina óssea correlacionou  
233 negativamente ( $P = 0,03$ ) com a DMO do córtex lateral do metacarpo. E o marcador de reabsorção  
234 óssea CTX-1 tendeu a correlacionar negativamente ( $P \leq 0,06$ ) com a região do metacarpo córtex lateral  
235 e medular.

236 De modo geral, os dois marcadores de formação óssea, osteocalcina e fosfatase alcalina do  
237 osso, não correlacionaram com DMO, apenas o córtex lateral do metacarpo correlacionou  
238 negativamente com DMO, sendo que quanto maior DMO menor os marcadores séricos de formação  
239 óssea, pois se o osso tem grande DMO e conseqüentemente alta concentração de cálcio reservada no  
240 osso, não é necessário ou não há capacidade para armazenar mais cálcio. E então, os marcadores de  
241 formação óssea não precisam estar em alta atividade para formar osso e então reservar cálcio (Goff,  
242 2000). Em relação ou CTX-1 que é um marcador de reabsorção óssea, ou utilização da reserva mineral  
243 do osso, quanto maior DMO menor o CTX-1, ou seja, quanto maior a reserva de cálcio no osso maior  
244 a DMO que significa que está ocorrendo menor reabsorção no osso ou menor utilização de cálcio dos  
245 ossos (Goff, 2000).

## CONCLUSÃO

O estudo, nas condições em que foi realizado, permitiu concluir que a densidade mineral óssea determinada por densitometria óptica em imagem radiográfica é uma metodologia de reprodutibilidade e de baixo custo, devido a utilização somente do raio X que pode ser empregado na avaliação da DMO em vacas leiteiras em lactação.

Os valores médios da DMO de vacas em lactação do carpo acessório, córtex lateral do metacarpo, córtex medial do metacarpo e da região medular do metacarpo, apresentaram valores médios de 14,91; 27,45; 25,25 e 16,06 mmAl respectivamente. A DMO foi maior em animais com maior idade e DEL para todas as medidas, exceto para a região do carpo acessório. Maior DEL apresentou maior peso e cálcio total e cálcio ionizado. Animais com idade mais avançada apresentaram menor concentração de fósforo, e marcadores sanguíneos ósseos, fosfatase alcalina e CTX. A DMO em vacas leiteiras correlacionou positivamente e significativamente com cálcio total e cálcio ionizado com as regiões do carpo acessório, córtex lateral, medial e região medular do metacarpo. As regiões do metacarpo avaliadas correlacionaram positivamente com a DMO e com peso, porém, negativamente com CTX-1. Apenas a região do córtex lateral do metacarpo correlacionou negativamente com osteocalcina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-hiti, K., Thomas, B. J., Al-tikrity, S. A., Ettinger, K. V., Fremlin, J. H., Dabek, J. T. Spinal calcium: Its in vivo measurement in man. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*, 27:27-97, 1976.
- Araújo, C. S. S., Artoni, S. M. B., Araújo, L. F., Junqueira, O. M., Louzada, M. J. Q., Oliveira, D. Densidade óssea de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de aminoácidos e cálcio durante a fase final de criação. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 28:203-208, 2006.
- Cameron, J. R., Mazess, R. B., Sorenson, J. A. Precision and accuracy of bone mineral determination by direct photon absorptiometry. *Investigative radiology*, 3:141-150, 1968.
- Coates, D. B., Dixon, R. M., Mayer, R. J., Murray, R. M. Validation of single photon absorptiometry for on-farm measurement of density and mineral content of tail bone in cattle. *Animal Production Science*, 56:2054-2059, 2015.
- Delaquerriere-Richardson, L., Anderson, C., Jorch, U. M., Cook, M. Radiographic morphometry and radiographic photodensitometry of the femur in the Beagle at 13 and 21 months. *American Journal Veterinary Research*, 43(12):2255-2258, 1982.
- Egger-Danner, C., Cole, J. B., Pryce, J. E., Gengler, N., Heringstad, B., Bradley, A., Stock K. F. Invited review: Overview of new traits and phenotyping strategies in dairy cattle with a focus on functional traits. *Animal*, 9:191–207, 2015.
- Fraser, D. 2008. *Understanding Animal Welfare: The Science in its Cultural Context*. Wiley-Blackwell, Ames, IA.

- 288  
 289 Fukuda, S., Iida, H. Age-related changes in bone mineral density, cross-sectional area and the straight  
 290 of long bones in the hind limbs and first lumbar vertebrae in female wistar rats. *Journal of Veterinary*  
 291 *Medical Science*, 66(7):755-760, 2004.
- 292  
 293 Goff, J. P. Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders. *Metabolic disorders of ruminants.*  
 294 *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16:319–337, 2000.
- 295  
 296 Inui, A., Itamoto, K., Takuma, T., Tsutsumi, H., Tanigawa, M., Hayasaki, M., Taura, Y., Mamba, K.  
 297 Age-related changes of bone mineral density and microarchitecture in miniature pigs. *Journal of*  
 298 *Veterinary Medical Science*, 66(6):599-609, 2004.
- 299  
 300 Knaus, W. Dairy cows trapped between performance demands and adaptability *Journal of the Science*  
 301 *of Food and Agriculture*, 89:1107–1114, 2009.
- 302  
 303 Lipscomb, V. J., Lawes, T. J., Goodship, A. E., Muir, P. Asymmetric densitometric and mechanical  
 304 adaptation of the left fifth metacarpal bone in racing greyhounds. *Veterinary Record*, 148:308-311,  
 305 2001.
- 306  
 307 Louzada, M. J. Q. **Otimização da Técnica de Densitometria Óptica em Imagens radiográficas de**  
 308 **Peças Ósseas. Estudo "In Vitro"**. Campinas, 1994. 191 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de  
 309 Engenharia Elétrica, Universidade Estadual de Campinas.
- 310  
 311 Louzada, M. J. Q., Pelá, C. A., Belangero, W. D., Santos-Pinto, R. Densidade de peças ósseas de  
 312 frangos. Estudo pela densitometria óptica radiográfica. *Veterinária e Zootecnia*, 9:95-109, 1997.
- 313  
 314 Louzada, M. J. Q., Pelá, C. A., Belangero, W. D., Santos-Pinto, R. Metodologia para a avaliação de  
 315 densidade em imagem radiográfica. *RBE – Caderno de Engenharia Biomédica*, 14(2):37- 47, 1998.
- 316  
 317 Muramoto, C., Stermann, F. A., Fonseca Pinto, A. C. B. C. Estabelecimento de valores de densidade  
 318 mineral óssea (DMO) das regiões metafisária e diafisária do rádio de cães da raça Poodle por meio da  
 319 Densitometria Óptica Radiográfica. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*  
 320 42(2):89-97, 2005.
- 321  
 322 Nowak, R. M., Walker, E. P. 1999. *Walker's Mammals of the World*. Vol. 1. JHU Press, Baltimore,  
 323 MD.
- 324  
 325 Oltenacu, P. A., Broom, D. M.. The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare  
 326 of dairy cows. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 19:39–49, 2010.
- 327  
 328 Pratt Jr., G. W. An in vivo method of ultrasonically evaluating bone strength. In: *Proceedings Annual*  
 329 *Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 13:26-29, 1980.
- 330  
 331 Rahal, S. C., Mortari, A. C., Caporali, E. H. G., Vulcano, L. C., Santos, F. A. M., Takahira, R. K.,  
 332 Crocci, A. J. Densitometria óptica radiográfica na avaliação do hiperparatireoidismo secundário  
 333 nutricional induzido em gatos jovens. *Ciência Rural*, 32(3):421- 425, 2002.
- 334  
 335 Reich, N. E., Seidelmann, F. E., Tubbs, R. R., Macintyre, W. J., Meaney, T. F., Alfydi, R. J., Pepe, R.  
 336 G. Determination of bone mineral content using CT scanning. *American Journal of Roentgenology*,  
 337 127(4):593, 1976.

- 338  
339 Robson, G. F., Balieiro, J. C. C., Sterman, F. A., Fonseca, A. C. B. C., Miglino, M. A., Zatz, M.,  
340 Auada, C. R. F. Estudo longitudinal da densidade mineral óssea em cães jovens da raça Golden  
341 Retriever: Correlações com idade e peso corpóreo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and*  
342 *Animal Science*, 43(5):681-687, 2006.
- 343  
344 SAS Institute. 2011. SAS/STAT 9.3 User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, NC.  
345
- 346 Stoliker, H. E., Dunlap, H. L., Kronfeld, D. S. Bone mineral measurement by photon densitometry in  
347 racing sled dogs, and its relationship to body weight, sex and bone fractures. *Veterinary Medicine*  
348 *Small Animal Clinician*, 6(3):545-1550, 1976.
- 349  
350 Tóth, P., Horváth, C., Ferencz, V., Nagy, K., Gligor, N., Szenci, O., Bodó, G. Assessment of the  
351 mineral density and mineral content of the equine third metacarpal and first phalanx bone by dual  
352 energy x-ray absorptiometry. *Acta Veterinaria Hungarica*, 58(3):317-329, 2010.
- 353  
354 Vanderschueren, D., Vandenput, L., Boonen, S., Lindberg, M. K., Bouillon, R., Ohlsson, C. Androgens  
355 and bone. *Endocrine reviews*, 25(3):389-425, 2004.
- 356  
357 Vulcano, L. C., Ciarlini, L. D. R. P., Louzada, M. J. Q., Caldas, E. L. C. Valores normais da densidade  
358 óssea do carpo ulnar em potros em crescimento da raça Quarto de Milha através da densitometria  
359 óptica radiográfica. *A Hora Veterinária*, 17(100):52-54, 1997.
- 360  
361 Vulcano, L. C., Santos, F. A. M. Determination and padronization of normal values of bone mineral  
362 density (BMD) of the accessory carpus bone in young Thoroughbred horse using optical densitometry  
363 in radiographic image. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 40:54-61, 2003.
- 364  
365 Vulcano, L. C., Santos, F. A. M., Godoy, C. L. B. Determinação da densidade mineral óssea da  
366 extremidade distal do rádio-ulna em gatos: correlação entre peso, sexo e idade. *Ciência Rural*,  
367 38(1):124-128, 2008.
- 368  
369 Wathes, D. C., Brickell, J. S., Bourne, N. E., Swali, A., Cheng Z. Factors influencing heifer survival  
370 and fertility on commercial dairy farms. *Animal*, 2:1135-1143, 2008.

371 Tabela 1 – Densidade mineral óssea (mm Al), peso vivo (Kg) e concentrações no sangue (mg/dL) de cálcio total, cálcio ionizado, fósforo e  
 372 magnésio de vacas leiteiras com idade menor ( $1157 \pm 217$  dias. N = 12) ou maior ( $1897 \pm 338$  dias. N = 17) que 48 meses aos 218 (D0) e aos 302  
 373 (D84) ( $\pm 131$ ) dias em lactação (DEL) e concentrações no sangue (ng/mL) de osteocalcina, fosfatase óssea e telopeptídeo carboxiterminal do  
 374 colágeno tipo I (CTX-1) aos  $302 \pm 131$  dias em lactação.

	Idade		EPM	DEL		EPM	Valor de <i>P</i>		
	< 48	> 48		DO	D84		Idade	DEL	Idade × DEL
Densidade óssea									
Carpó acessório	15,00	14,86	0,780	14,26	15,61	0,731	0,90	0,16	0,65
Metacarpo córtex lateral	23,39	29,34	1,738	20,45	32,28	1,576	0,02	< 0,01	0,47
Metacarpo córtex medial	22,44	26,49	1,487	18,88	30,05	1,520	0,06	< 0,01	0,47
Metacarpo região medular	13,29	17,36	1,220	10,64	20,00	1,273	0,02	< 0,01	0,86
Peso	623,54	681,12	20,367	633,69	670,97	14,540	0,05	< 0,01	0,99
Cálcio total	9,15	9,18	0,067	8,95	9,38	0,056	0,76	< 0,01	0,28
Cálcio ionizado	5,00	4,98	0,035	4,87	5,11	0,031	0,74	< 0,01	0,27
Fósforo	6,66	6,10	0,186	6,37	6,39	0,158	0,04	0,91	0,20
Magnésio	2,23	2,29	0,048	2,27	2,26	0,039	0,35	0,94	0,71
Osteocalcina	4,54	3,47	0,842				0,37		
Fosfatase óssea	32,21	25,31	2,580				0,07		
CTX-1	0,56	0,32	0,072				0,03		

376 Tabela 2 – Densidade mineral óssea (mm Al), idade (dias), peso vivo (Kg) e concentrações no sangue  
 377 (mg/dL) de cálcio total, cálcio ionizado, fósforo e magnésio de 29 vacas Holandesas aos 218 e 302 ( $\pm$   
 378 131) dias em lactação

	Média	DP	Mínimo	Máximo
Densidade óssea				
Carpo acessório	14,943	3,7320	8,221	24,863
Metacarpo córtex lateral	27,063	10,2626	11,291	55,449
Metacarpo córtex medial	25,019	9,6215	12,383	55,876
Metacarpo região medular	16,148	8,7922	6,873	49,648
Idade	1590	466	809	2520
Peso vivo	656	82,3	459	835
Cálcio total	9,17	0,355	8,40	9,80
Cálcio ionizado	4,99	0,200	4,60	5,40
Fósforo	6,32	0,863	4,40	8,90
Magnésio	2,26	0,205	1,70	2,80

379

380 Tabela 3 – Coeficiente de correlação linear entre a densidade mineral óssea (mm Al) do carpo  
 381 acessório, metacarpo córtex lateral, metacarpo córtex medial e região medular do metacarpo e a idade  
 382 (dias), peso vivo (Kg) e concentração no sangue (mg/dL) de cálcio total (CaT), cálcio ionizado (CaI),  
 383 fósforo (P) e magnésio (Mg) de 29 vacas Holandesas aos 218 e 302 ( $\pm$  131) dias em lactação

	Idade	Peso	CaT	CaI	P	Mg
Carpo acessório	0,009	0,12	0,39 <sup>a</sup>	0,39 <sup>a</sup>	0,06	-0,027
Metacarpo córtex lateral	0,19	0,35 <sup>a</sup>	0,28 <sup>a</sup>	0,37 <sup>a</sup>	-0,05	-0,11
Metacarpo córtex medial	0,12	0,29 <sup>a</sup>	0,33 <sup>a</sup>	0,40 <sup>a</sup>	0,01	-0,07
Metacarpo região medular	0,06	0,24 <sup>b</sup>	0,37 <sup>a</sup>	0,44 <sup>a</sup>	0,03	-0,04

384 <sup>a</sup>  $P \leq 0,05$  <sup>b</sup>  $P \leq 0,10$

385 Tabela 4 – Densidade mineral óssea (mm Al), idade (dias), peso vivo (Kg) e concentrações no sangue  
 386 (ng/mL) de osteocalcina, fosfatase óssea e telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX-1)  
 387 de 29 vacas Holandesas aos  $302 \pm 131$  dias em lactação

	Média	DP	Mínimo	Máximo
Densidade óssea				
Carpo acessório	15,574	4,0763	9,086	24,863
Metacarpo córtex lateral	32,669	8,6814	15,678	55,448
Metacarpo córtex medial	30,255	9,1602	18,178	55,875
Metacarpo região medular	20,500	9,1674	9,830	49,647
Idade	1590	470	809	2520
Peso vivo	675	82,6	484	835
Osteocalcina	3,94	3,067	0,60	11,40
Fosfatase óssea	28,38	9,890	6,72	43,47
CTX-1	0,421	0,2921	0,1291	1,284

388



389 Tabela 5 – Coeficiente de correlação linear entre a densidade mineral óssea (mm Al) do carpo  
 390 acessório, metacarpo córtex lateral, metacarpo córtex medial e região medular do metacarpo e a idade  
 391 (dias), peso vivo (Kg) e concentração no sangue (ng/mL) de osteocalcina, fosfatase óssea e  
 392 telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX-1) de 29 vacas Holandesas aos  $302 \pm 131$  dias  
 393 em lactação

	Idade	Peso	Osteocalcina	Fosfatase Óssea	CTX-1
Carpo acessório	0,02	0,08	-0,09	0,22	0,07
Metacarpo córtex lateral	0,19	0,29	-0,09	-0,40 <sup>a</sup>	-0,34 <sup>b</sup>
Metacarpo córtex medial	0,07	0,17	-0,07	-0,24	-0,28
Metacarpo região medular	0,21	0,32 <sup>b</sup>	-0,09	-0,13	-0,35 <sup>a</sup>

394 <sup>a</sup>  $P \leq 0,05$  <sup>b</sup>  $P \leq 0,10$



395

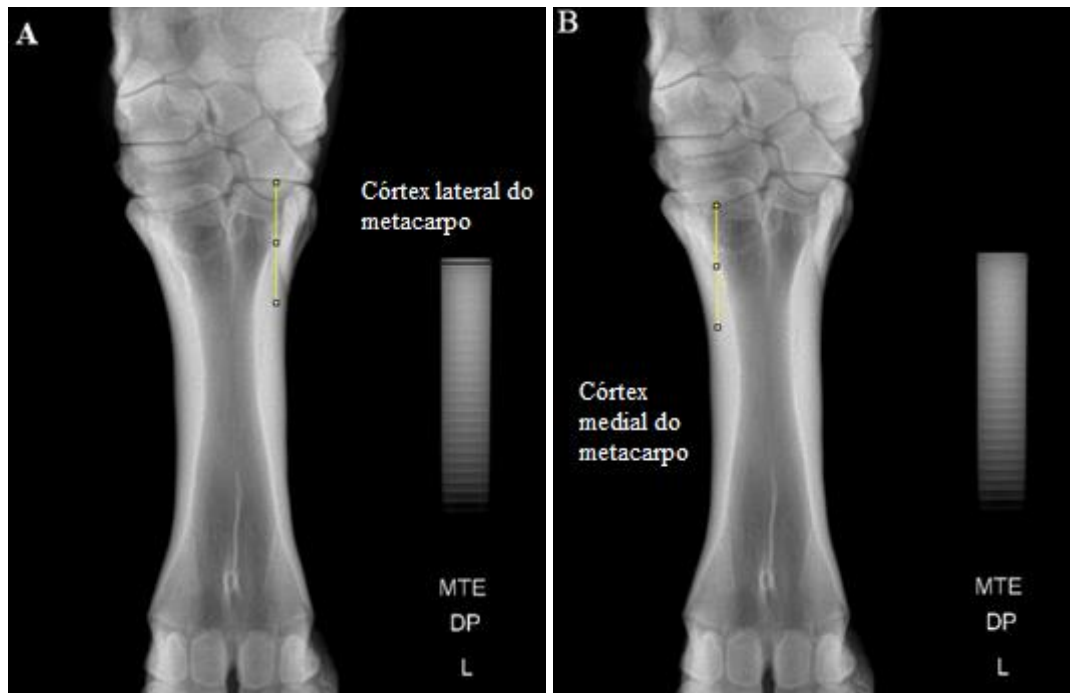
396 Figura 1. Penetrômetro, referência densitométrica.

397



398

399 Figura 2. Carpo acessório do membro torácico esquerdo.



400

401 Figura 3. CórTEX lateral do metacarpo do membro torácico esquerdo. A: córTEX lateral. B: córTEX medial  
 402 (6 cm da superfície do osso subcondral da epífise proximal do metacarpo).

403



404

405 Figura 4. Região medular do metacarpo do membro torácico esquerdo (3 cm da superfície do osso  
 406 subcondral da epífise proximal do metacarpo).

**ARTIGO 2****Calcium balance, bone density, and performance of late-lactation dairy cows with supraphysiological concentration of blood vitamin D**

Izabella C. O. Ribeiro\*, Rayana B. Silva†, Letícia N Resende\*, Josiane P. Santos\*, Lucas C Resende\*, Antônio Carlos C. Lacreata Júnior\*, Renata A. N. Pereira §, and Marcos N. Pereira\*

\*Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG 37200-900, Brazil

†Better Nature Research Center, Lavras, MG 37203-016, Brazil

§Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Lavras, MG 37200-900, Brazil

**ABSTRACT**

Vitamin D can affect Ca metabolism, bone remodeling, and lactation performance of dairy cows. The objective of this experiment was to evaluate lactation performance, body Ca retention, and bone density of late lactation dairy cows subjected to supraphysiological concentration of blood 25(OH)D for 12 weeks. We hypothesized that the increase in blood 25(OH)D would improve Ca retention, bone mineralization, and lactation performance. Thirty Holsteins cows ( $230 \pm 137$  days in lactation, 8 primiparous) were individually fed a standard total mixed ration for 14 days and a treatment for 84 days. Treatments were Phy (placebo) or Supra (40,000 IU/d of calcidiol) vitamin D level or placebo. The basal diet contained 1,033 UI/kg of dry matter (DM) of cholecalciferol and 0.77% Ca in DM. The intake of vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol) from the diet was 23,800 IU/d. Data was analyzed with Proc Mixed of as a covariated adjusted randomized block design with repeated measures over time. Significance was declared at  $P \leq 0.01$  and trends at  $P \leq 0.10$ . The average plasma concentration of 25(OH)D of Supra was twice the concentration of Phy (117 vs 53 ng/mL). The increase in the concentration of plasma 25(OH)D in response to calcidiol supplementation was of larger magnitude on day 84 (+ 84.4 ng/mL) than on day 28 (+ 45.3 ng/mL). There was not a deficiency of vitamin D in this group of cows. The concentrations of both forms of total Ca and ionized Ca were increased by

29 vitamin D on days 28 and 56, but there was no treatment difference on day 84 (9.4 mg/dL). Cows on  
30 Supra excreted more Ca in urine (g/d) in week 12 than cows on Phy and there was no difference in the  
31 flow of urinary Ca on week 4. The total tract apparent digestibility of Ca was not affected by vitamin  
32 D level. The markers of bone deposition osteocalcin (OC) and bone alkaline phosphatase (BAP) were  
33 reduced in Supra on day 84 and did not differ in day 28. The marker of bone resorption CTX-1 did not  
34 differ. The maintenance of a constant blood Ca concentration with high vitamin D supply in day 84,  
35 in spite of the greater loss of urinary Ca and similar Ca absorption from the digestive tract, was  
36 explained by a reduction in Ca deposition in bones. The estimated retention of Ca in the body did not  
37 differ. There were trends for reductions in the optical density of accessory carpal and medullar region  
38 of metacarpal bones with Supra, suggestive of osteoporosis. The Supra level of vitamin D was  
39 associated to increased milk yield (31.6 vs 30.9 kg/d) and had no effect on DMI (23.0 kg/d). The  
40 energy-corrected milk, feed efficiencies, body condition score, body weight gain, and the total tract  
41 apparent digestibility of dry matter and organic matter did not differ. Supra was associated with a  
42 reduction in milk somatic cell count (SCC) from 105,000 to 83,500 cells/mL, suggestive of a positive  
43 action of vitamin D on mammary gland immunity. Dairy cows exposed for 12 weeks to twice as much  
44 concentration of blood 25(OH)D than cows with 50 ng/mL produced more milk at similar intake, had  
45 lower SCC in milk, had higher concentration of blood Ca and excretion of Ca in urine, and had reduced  
46 bone mineral deposition markers and bone optical density.

47

**48 KEY WORDS**

49 Bone remodeling, calcium, dairy cows, vitamin D.

## 50 INTRODUCTION

51 Vitamin D acts on bone (Kitazawa et al., 2003) and energy (Rodney et al., 2018b) metabolism,  
52 immune response (Nelson et al., 2010; Lippolis et al., 2011), and Ca and P homeostasis (Pansu et al.,  
53 1983; Kitazawa et al., 2003; Hoenderop et al., 2005) in dairy cows. Cattle acquire vitamin D mainly  
54 as vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol) synthesized endogenously from the steroidal precursor 7-  
55 dehydrocholesterol through the action of solar ultraviolet rays (MacLaughlin et al., 1982) or as  
56 supplemental vitamin D<sub>3</sub> from the diet. In the body, vitamins D<sub>2</sub> (ergocalciferol) and D<sub>3</sub> undergo  
57 hydroxylation in the liver to form 25-hydroxyvitamin D [**25(OH)D**, calcidiol. Refers to D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub>  
58 metabolites]. This molecule is hydroxylated in the kidney by the enzyme 1 $\alpha$ -hydroxylase forming 1,25-  
59 dihydroxycholecalciferol [1,25(OH)<sub>2</sub>D, calcitriol], the biologically active form of vitamin D.

60 The concentration of 25(OH)D in serum or plasma is considered the best indicator of the  
61 vitamin D status of an animal, as it is the main circulating metabolite of vitamin D and it is relatively  
62 stable in blood (Sommerfeldt et al., 1983; Horst, 1976). The average 25(OH)D concentration in blood  
63 serum of 702 cows from 12 dairy herds was 68  $\pm$  22 ng/mL (mean  $\pm$  SD) in a north-American survey  
64 (Nelson et al, 2016). Around 80% of samples had concentrations between 40 and 100 ng/mL and 22%  
65 of the cows receiving 20,000 IU/d of cholecalciferol [the dairy NRC (2001) recommendation] had  
66 serum 25(OH)D below the traditionally recommended minimum value of 30 ng/mL. The  
67 supplementation of 25(OH)D<sub>3</sub> to achieve supraphysiological serum 25(OH)D concentration (228 vs  
68 59 ng/mL) pre and post-partum (Rodney et al., 2018b) has improved health and performance of dairy  
69 cows in early lactation (Martinez et al., 2018a). Achieving high blood 25(OH)D concentration may  
70 favor immune function (Cantorna et al., 2004, Nelson et al, 2010) and Ca and P deposition in bones of  
71 dairy cows in late lactation, potentially improving Ca storage for the next lactation and reducing  
72 osteoporosis in mature cows (McGrath et al., 2012). However, the long-term exposure to  
73 supraphysiological concentration of blood 25(OH)D has induced enhanced intestinal Ca absorption  
74 and bone resorption, inducing hypercalcemia, nephrocalcinosis, increased osteoclastic activity, and

75 osteoporosis in humans (Davies et al., 1986; Rizzoli et al., 1994; Selby et al., 1995) and rats (Lindgren  
76 and DeLuca, 1982).

77 The objective of this experiment was to evaluate lactation performance, body Ca retention, and  
78 bone density of late lactation dairy cows subjected to supraphysiological concentration of blood  
79 25(OH)D for 12 weeks. We hypothesized that the increase in blood 25(OH)D would improve Ca  
80 retention, bone mineralization, and lactation performance.

## 81 MATERIALS AND METHODS

### 82 *Cows, diets, and experimental design*

83 The experiment was conducted from in an open-walled, sand-bedded tie-stall barn with fans  
84 and high-pressure sprinklers. Thirty Holstein cows ( $230 \pm 137$  days in lactation at the beginning of the  
85 experiment, 8 primiparous) were individually fed the same total mixed ration (**TMR**) for a 14-d  
86 standardization period. On days 11 to 14 of this period, dry matter (**DM**) intake (**DMI**), milk yield,  
87 milk components, body weight (**BW**), body condition score (**BCS**), serum concentrations of Mg,  
88 ionized Ca, total Ca, and P, and bone density were measured and used as covariate in the statistical  
89 model. Cows were blocked in pairs by parity (1 vs.  $\geq 2$ ) and milk yield and received a treatment for 12  
90 weeks. Treatments aimed at achieving physiological (**Phy**) or supraphysiological (**Supra**)  
91 concentrations of 25(OH)D in plasma. Capsules containing 25(OH)D<sub>3</sub> (40,000 IU/day) or placebo  
92 were orally given to each cow 3×/d before milking. The basal diet contained 1,033 UI/kg of DM of  
93 cholecalciferol and was supposedly adequate according to the NRC (2001) recommendation (30 IU/kg  
94 BW). The TMR was mixed in a stationary feed mixer and offered at 0700 and 1300 h in amounts to  
95 allow for 10 to 15% of offered as daily refusal per cow. Feed was pushed up at least 10×/d. Cows were  
96 milked 3×/d starting at 0500, 1300, and 2000 h in an adjacent herring-bone parlor.

97 Samples of feeds and orts per cow were obtained daily and frozen for the formation of weekly  
98 composites based on equal as-fed amounts of daily samples. Composite samples were dried in forced-  
99 air oven at 55°C for 72 h and ground to pass a 1-mm mesh screen. The DM concentration was

100 determined by drying at 100°C for 24 h. The composition of the consumed diet in nutrients was  
101 calculated for each cow based on the amounts of offered ingredients and orts on a DM basis. The crude  
102 protein concentration was determined with a micro Kjeldahl apparatus (AOAC International, 2012,  
103 method 991.20), ash by incineration at 550°C for 8 h, the ash-free neutral detergent fiber by filtration  
104 in porous crucibles with heat stable alpha-amylase and sodium sulfite (Van Soest et al., 1991, and the  
105 ether extract as in AOAC International (2012), method 2002.04. Starch was analyzed enzymatically  
106 according to Hall (2009). The composition of the consumed diet in nutrients was calculated by the  
107 total nutrient intake of all cows divided by the total DMI (Table 1).

### 108 *Performance variables*

109 Milk yield and DMI were recorded daily. Milk samples were collected in proportion to the  
110 amount produced on each of the six consecutive milkings on days 6 and 7 of each experimental week.  
111 Samples were stored in flasks containing 2-bromo-2-nitropropane-1-3-diol under refrigeration for at  
112 most 2 days until shipping to a commercial laboratory. Milk components, somatic cell count (**SCC**),  
113 and milk urea-N (**MUN**) were measured by mid-infrared analysis (Bentley Instruments Inc., Chaska,  
114 MN) at the Laboratory of the Paraná State Holstein Breeders Association (APCBRH, Curitiba, Brazil).  
115 Milk energy secretion (Mcal/d) was (NRC, 2001):  $[(0.0929 \times \% \text{ fat}) + (0.0547 \times \% \text{ protein}) + (0.0395$   
116  $\times \% \text{ lactose})] \times \text{kg of milk}$ . The secretion of energy corrected milk (**ECM**, kg/d) was: Milk energy  
117 secretion/0.70 (assumes 0.70 Mcal/kg of milk with 3.7 % fat, 3.2 % protein, and 4.6 % lactose).

118 The SCC was transformed to a linear scale from 0 to 9 in which scores represented the  
119 following values of SCC ( $\times 1,000$  cells/mL): 12.5 for SCC score 0; 25 for SCC score 1; 50 for SCC  
120 score 2; 100 for SCC score 3; 200 for SCC score 4; 400 for SCC score 5; 800 for SCC score 6; 1,600  
121 for SCC score 7; 3,200 for SCC score 8; and 6,400 for SCC score 9. The SCC score was calculated  
122 from the natural logarithm of the measured SCC (1,000 cells/mL) and the above mentioned SCC value  
123 of each score:  $\text{SCC score} = -3.6438 + 1.4427 \times \text{Ln}(\text{SCC})$ . Negative values were rounded to zero.



124 The BW and BCS were measured at 14-d intervals. The BW was measured after the morning  
125 milking during two consecutive days and BCS (1 to 5; Wildman et al., 1982) was the mean of 3  
126 independent evaluators. The daily BW gain was calculated as the slope of the linear regression of BW  
127 over days 0, 14, 28, 42, 56, 70, and 84.

### 128 *Blood samples*

129 Blood serum samples were obtained 12 h post-morning feeding from the coccygeal vessels on  
130 days 0, 28, 56, and 84 to evaluate the concentrations of total Ca, P, ionized Ca (**iCa**), and Mg. Mineral  
131 concentrations in serum were analyzed by spectrophotometry (AU 480. Beckman Coulter Diagnostics,  
132 Brea, USA) on the same day of collection in a commercial laboratory (Laboratório Santa Cecília,  
133 Lavras, Brazil).

134 On days 28 and 84, plasma samples were obtained for 25(OH)D analysis and serum samples  
135 for osteocalcin (**OC**), bone alkaline phosphatase (**BAP**) and C-terminal telopeptide of type 1 collagen  
136 (**CTX-1**) evaluations. The quantification of 25(OH)D was done by liquid chromatography (Agilent  
137 1260. Waldbronn, Germany) coupled to triple quadrupole mass spectrometry at CEMSA (Centro de  
138 Espectrometria de Massas Aplicada, São Paulo, Brazil). The sample was collected in vacutainer tubes  
139 containing EDTA and after centrifugation ( $1,800 \times g$  for 10 min) the plasma was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The  
140 chromatographic conditions were: LC column (Ascentis Express C18, 50 x 3.0 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ . Supelco,  
141 Belle Fonte, USA), mobile phase (A: water + 0.05% formic acid and B: methanol acetonitrile 8/2 +  
142 0.05% formic acid), column temp ( $38^{\circ}\text{C}$ ), injection volume (10  $\mu\text{L}$ , temperature autosampler  $8^{\circ}\text{C}$ ),  
143 run time (5 min + 1.2 min. extra to equilibrate the column), and wash needle solution (methanol).  
144 Ionization parameters for the analysis of the mass spectrometry (QTRAP3200. Framingham, USA)  
145 were: curtain gas (25 arbitrary unit), needle voltage (+4 arbitrary unit), source temperature ( $370^{\circ}\text{C}$ ),  
146 and gas 1 and nebulizer (35 arbitrary unit). The blood concentrations of OC and BAP were measured  
147 in a commercial laboratory (Vet Lab, Petrópolis, Brazil). The OC was analyzed with a commercial  
148 18-min sandwich assay (Elecsys N-MID, Roche Diagnostics, Manhein, Germany). The BAP activity

149 (SPIFE ALP-20; Helena Laboratories, Beaumont, USA) was measured using an automated  
 150 electrophoresis system (SPIFE 3000; Helena Laboratories, Beaumont, USA). The CTX-1 was  
 151 analyzed with a commercial kit [Serum Crosslaps ELISA (CTX-1); IDS Ltd, Tyne and Wear, United  
 152 Kingdom].

### 153 *Diet digestibility and mineral balance*

154 The total tract apparent digestibility of DM and organic matter (OM) and Ca and P balance  
 155 were determined by collection of feces and urine on weeks 4 (days 26 to 28) and 12 (days 82 to 84).  
 156 Concentrations of DM and ash were determined as previously described. Feces were collected  
 157 concurrent to defecation during three 8-h sampling periods and weighed. The second and third  
 158 sampling periods were each delayed by 8 hours, thus representing a 24-h collection. Fecal aliquots  
 159 (equal fresh weight basis) were immediately frozen along the collection period and a composite sample  
 160 was formed per cow. Composite fecal samples were dehydrated for 72 h at 55°C in a forced air oven.  
 161 Total urinary output was collected in buckets, simultaneously to fecal sampling. A composite milk  
 162 sample was formed per cow during the period of fecal and urine sampling and stored at - 20°C.

163 The Ca concentrations in feeds, orts, feces, urine, and milk (Table 2) was measured according  
 164 to Malavolta et al. (1997) by atomic absorption spectrometry (SpectrAA 100. Varian Australia Pty  
 165 Ltd, Mulgrave, Australia) at 422.7 nm wavelength and lamp current of 10 mA. Air-acetylene flame  
 166 was used. The concentration of P was analyzed by visible ultraviolet spectroscopy (SP-22. Biospectro.  
 167 Labmais. Curitiba, Brazil) at 420 nm wavelength. The P in urine was not detectable.

168 During weeks 4 and 12, blood serum and urine were analyzed for creatinine (Creatinine.  
 169 Bioclin K016, Belo Horizonte, Brazil). The glomerular filtration rate (**GFR**) and the Ca fractional  
 170 excretion rate (**kER**) were estimated with the equations of Lefebvre et al. (2008):  $GFR (mL/min) =$   
 171  $[Ucr (mg/dL) \times V (mL)] / [Scr (mg/dL)]$ ;  $kER (\%/minute) = [UCa (mEq/g) \times V (mL)] / [SCa (mg/dL)$   
 172  $\times GFR (mL/min)] \times 100$ . Where, Ucr = urinary creatinine concentration; V = urinary volume; Scr =  
 173 plasma creatinine concentration; Uca = urinary concentration of Ca; SCa = plasma Ca concentration.

**174 Bone density**

175 Bone mineral density was evaluated on days 0 and 84 by optical densitometry using radiographic  
176 images of bones accessory carpal and metacarpal of the left thoracic limb (Ribeiro et al., XXXX). Two  
177 radiographs were obtained from each cow per day for evaluation of regions accessory carpal, lateral  
178 cortex of metacarpal, medial cortex of metacarpal, and medullar region of metacarpal. A portable x-  
179 ray machine (RX 1060 HF, Ecoray. Seoul, Korea) was used to obtain radiographic images standardized  
180 to 100 kVp and 60 mAs/sec. An aluminum (Alloy 6063) stepwedge penetrometer was used as a  
181 densitometry reference. The penetrometer had 29 steps with 1.00 mm depth and  $5 \times 15$  mm surface.  
182 The pixels of images from each bone area and from the penetrometer were evaluated with Java image  
183 processing software (ImageJ. National Institutes of Health, Bethesda, USA). Each sampling area was  
184 evaluated by the same three independent evaluators and the mean value was used for each cow.  
185 Exponential equations were developed for each cow to relate the pixel of each stair of the penetrometer  
186 to the optical density expressed in mm of Al. The coefficient of determination of the exponential  
187 equations was 0.9899 on average, ranging from 0.9621 to 0.9982.

**188 Statistical Analysis**

189 Data obtained over time were analyzed with the PROC MIXED of SAS (version 9.3, 2011;  
190 SAS Institute Inc., Cary, NC). The statistical model contained the continuous covariate effect  
191 (measurement of the same variable at the end of the standardization period), the random effect of block  
192 (1 to 15), the fixed effects of vitamin D level (Phy, Supra) and time (day or week), and the interaction  
193 between vitamin D level and time. Cow nested within vitamin D level was defined as random. For  
194 each variable, the best covariance structure was defined by the Schwarz's Bayesian criteria between  
195 first-order autoregressive and compound symmetry. Degrees of freedom were calculated using the  
196 Kenward-Roger option. Similar models were used for variables measured once during the experiment  
197 and for variables without the covariate adjustment by removing the covariate, time, and its interaction  
198 with treatment from the previous model. Significance was declared at  $P \leq 0.05$  and trends at  $P \leq 0.10$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

199

200 The average intake of cholecalciferol from the basal diet was 23,800 IU/d or 35.7 IU/kg of BW,  
201 slightly above the NRC (2001) recommendation of 30 IU/kg of BW. Two groups of cows differing in  
202 25(OH)D concentration in plasma were obtained. The average plasma concentration of 25(OH)D of  
203 Supra was twice the concentration of Phy (117 vs 53 ng/mL) (Table 3). The increase in the  
204 concentration of plasma 25(OH)D in response to calcidiol supplementation was of larger magnitude  
205 on day 84 (+ 84.4 ng/mL) than on day 28 (+ 45.3 ng/mL), suggestive of an accumulation of the  
206 metabolite in blood over time ( $P < 0.01$  for the interaction of vitamin D level and day of sampling).  
207 The plasma concentration of 25(OH)D ranged from 37 to 168 ng/mL (Figure 1), indicating that there  
208 was not a deficiency of vitamin D in this group of cows, assuming 30 ng/mL as a reasonable minimum  
209 threshold requirement (Nelson et al., 2012). The NRC (2001) recommendation for cholecalciferol  
210 supplementation adopted to formulate the basal diet was apparently adequate to meet the requirement  
211 of all cows. Cows had access to sunlight for at most 2 hours/day only during the midday milking  
212 routine (farm routine).

213 Similarly to the observed for the variation in plasma 25(OH)D over the period of sampling,  
214 there were significant interactions between vitamin D level and the day of sampling for the  
215 concentrations in serum of total Ca and iCa (Table 4). The concentrations of both forms of Ca were  
216 increased by vitamin D on days 28 and 56, but there was no treatment difference on day 84 (Figures 2  
217 and 3), suggestive of long-term regulation of Ca homeostasis. Cows on Phy took longer to achieve  
218 maximum blood Ca concentration on day 84 than cows on Supra. The supplementation of calcidiol  
219 has increased blood Ca concentration (McGrath et al., 2012), although no difference was observed for  
220 cows in early lactation (Rivera et al. 2005; Rodney et al., 2018b). The concentrations in serum of Mg  
221 and P did not differ (Table 4).

222 The nutritional balances of Ca and P in weeks 4 and 12 are reported in Table 5. Cows on Supra  
223 excreted more Ca in urine (g/d) in week 12 than cows on Phy and there was no difference in the flow

224 of urinary Ca on week 4. The proportion of Ca intake excreted in urine was lowest on Phy in week 12  
225 and there was no effect of vitamin D level on the urinary Ca excretion on week 4. Although the GFR  
226 of the kidney tended to be lower on week 12 than 4, it did not differ between vitamin D levels. The  
227 kEF was lowest on Phy in week 12 and highest on Supra in week 12. Fecal Ca excretion as a proportion  
228 of Ca intake was higher on week 12 than 4, but did not differ between vitamin D levels.

229 In order to maintain long-term Ca homeostasis, the urinary Ca excretion was increased by  
230 vitamin D, and although fecal Ca excretion was increased over time, the total tract apparent  
231 digestibility of Ca was not affected by vitamin D. This data suggests that the concentration of plasma  
232 25(OH)D in the range evaluated did not affect Ca absorption from the digestive tract and affected Ca  
233 excretion in urine. Supra blood Ca in response to 25(OH)D may have lowered parathyroid hormone  
234 (PTH) and reduced renal Ca resorption (Besarab and Swanson, 1982). The increase in blood Ca in  
235 days 28 and 56 in response to vitamin D did not result from increased Ca digestibility or reduced  
236 urinary excretion. Phosphorus balance was not affected by the variation imposed in the level of  
237 25(OH)D concentration in plasma, although the body retention of P tended to be reduced over time as  
238 the result of increased proportion of P intake excreted in feces.

239 The markers of bone deposition OC and BAP were reduced in Supra on day 84 and did not  
240 differ in day 28 (Table 3). The OC was reduced and BAP was increased with more days in lactation,  
241 independently of vitamin D level. Rodney et al. (2018a) did not observe an effect of calcidiol  
242 supplementation on OC of mid-lactation dairy cows, but the authors did not measure other indicators  
243 of change in bone remodeling. The marker of bone resorption CTX-1 did not differ, although there  
244 was a trend ( $P = 0.10$ ) for this marker to be increased by Supra in day 28 (0.56 vs 0.41 ng/mL). This  
245 suggests that the regulation of bone deposition by vitamin D was as short acting as the regulation of  
246 bone resorption. The maintenance of a constant blood Ca concentration with Supra vitamin D supply  
247 in day 84 (Figures 2 and 3), in spite of the greater loss of urinary Ca and similar Ca absorption from  
248 the digestive tract, was apparently explained by a reduction in Ca deposition in bones (Table 5). The

249 estimated retention of Ca in the body did not differ. The reduction in the bone deposition markers OC  
250 and BAP with Supra is consistent with the trends for reductions in optical density of accessory carpal  
251 and medullar region of metacarpal bones (Table 6). This is suggestive of osteoporosis in response to  
252 the exposure to supraphysiological concentration of vitamin D in plasma. This is not in accordance  
253 with our expectation that high 25(OH)D in plasma would increased bone resorption in hypercalcemia  
254 in an attempt to maintain plasma Ca within the normal range when parathyroid hormone (PTH) is  
255 absent (Hefti et al., 1983). When serum Ca levels are elevated, calcitonin is secreted which blocks  
256 bone resorption and suppresses PTH release (Peacock, 2010). The PTH activates osteoclasts to liberate  
257 Ca from bone and they are though to contribute to Ca mobilization from the bone during lactation  
258 (Kaya et al., 2017; Kovacs, 2017). Our data supports that bone deposition, and not bone resorption,  
259 was down-regulated when high plasma 25(OH)D concentration was induced for 12 weeks.  
260 Unfortunately, we did not measure PTH in blood.

261         The Supra level of vitamin D was associated to increased milk yield (+ 0.7 kg/d) and had no  
262 effect on DMI (Table 7). Fat percentage tended to be increased (+ 0.10%-units) and protein percentage  
263 tended to be reduced (- 0.06%) by Supra. The ECM, feed efficiencies, BCS, BW gain, and the total  
264 tract apparent digestibility of DM and OM did not differ. Consistent increase in daily milk yield  
265 occurred from days 56 to 69 of the experiment (Figure 4), suggesting that the positive effect of Supra  
266 on milk yield was not fast-acting. Supra was associated with a reduction in milk SCC from 105,000 to  
267 83,500 cells/mL (Table 7), suggestive of a positive action of vitamin D on mammary gland immunity.  
268 This is a plausible mechanism for the observed increase in milk yield in response to vitamin D, because  
269 immune cells and mammary epithelial cells utilize 25(OH)D<sub>3</sub> (Nelson et al., 2018). The 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>  
270 attracts defense cells so they can act on inflammation of the mammary gland of dairy cows (Nelson et  
271 al., 2010). Lippolis et al. (2011) demonstrated that the intramammary treatment with 25(OH)D<sub>3</sub> in  
272 cows with mastitis reduced total bacterial count and the severity of mastitis. The stimulus by  
273 1,25(OH)<sub>2</sub>D of the synthesis and secretion of prolactin by the pituitary gland may be another

274 explanation for the increase in milk yield with Supra (Delvin et al., 1990; Díaz et al., 2011). Mammary  
 275 synthesis of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> from 25(OH)D<sub>3</sub> have been demonstrated in human mammary cells and may  
 276 also contribute to mammary development and increased milk yield (Kemmis et al., 2006). A definite  
 277 mechanism for the positive response of Supra on milk yield cannot be ascribed from our data.

## 278 CONCLUSIONS

279 Dairy cows exposed for 12 weeks to twice as much concentration of blood 25(OH)D than cows  
 280 with 50 ng/mL produced more milk at similar intake, had lower SCC in milk, had higher concentration  
 281 of blood Ca and excretion of Ca in urine, and had reduced bone mineral deposition markers and bone  
 282 optical density.

## 283 REFERENCES

- 284 AOAC International. 2012. Official Methods of Analysis 19th ed. Assoc. Off. 409 Anal. Chem.,  
 285 Arlington, VA.
- 286 Besarab, A., and J. W. Swanson. 1982. Differences in effects of amino-terminal and intact parathyroid  
 287 hormone on calcium, phosphate, and cAMP excretion by the isolated perfused rat kidney. *Ren.*  
 288 *Physiol.* 5:261-271.
- 289 Cantorna, M. T. and B, Mahon. 2004. Mounting evidence for vitamin D as environmental factor  
 290 affecting autoimmune disease prevalence. *Exp. Bio. Med.* 229:1136-1142.
- 291 Davies, M., Mawer, E. B., and Freemont, A. J. 1986. The osteodystrophy of hypervitaminosis D: a  
 292 metabolic study. *Q. J. Med.* 5:911-919.
- 293 Delvin, E. E., L. Gagnon, A. Arabian, and W. Gibb. 1990. Influence of calcitriol on prolactin and  
 294 prostaglandin production by human decidua. *Mol. Cell. Endocrinol.* 71:177-183.
- 295 Díaz, L., I. Martínez-Reza, R. García-Becerra, L. González, F. Larrea, and I. Méndez. 2011. Calcitriol  
 296 stimulates prolactin expression in non-activated human peripheral blood mononuclear cells:  
 297 Breaking paradigms. *Cytokine* 55:188-194.
- 298 Hall, M. B. 2009. Determination of starch, including maltooligosaccharides, in animal feeds:  
 299 comparison of methods and a method recommended for AOAC collaborative study. *J. AOAC Int.*  
 300 92:42-49.
- 301 Hefti, E., U. Trechsel, H., Fleisch, and J. P. Bonjour. 1983. Nature of calcemic effect of  
 302 1,25dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in experimental hypoparathyroidism. *Am. J. Physiol.* 244:313-316.
- 303 Hoenderop, J. G., Nilius, B., and Bindels, R. J. 2005. Calcium absorption across epithelia. *Phys. Rev.*  
 304 85:373-422.
- 305 Horst, R. L. 1976. Studies on vitamin D and calcium metabolism in the parturient dairy cow and the  
 306 rat. Doctoral Thesis, University of Wisconsin.
- 307 Kaya, S., J., Basta-Pljakic, Z. Seref-Ferlence, R. J. Majeska, L. Cardoso, T. G. Bromage, Q. Zhang, C.  
 308 R. Flach, R. Mendelsohn, S. Yakar, S. P. Fritton, and M. B. Schaffler. 2017. Lactation-induced  
 309 changes in the volume of osteocyte lacunar-canalicular space alter mechanical properties in  
 310 cortical bone tissue. *J. Bone. Miner. Res.* 32:688-697.
- 311 Kemmis, C. M., S. M. Salvador, K. M. Smith, and J. Welsh. 2006. Human mammary epithelial cells  
 312 express CYP27B1 and are growth inhibited by 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, the major circulating form  
 313 of vitamin D-3. *J. Nutr.* 136:887-892.

- 314 Kitazawa, S., T. Kondo, and R. Kitazawa. 2003. Vitamin D<sub>3</sub> supports osteoclastogenesis via functional  
315 vitamin D response elements of human RANKL gene promoter. *J. Cell. Biochem.* 89:771–777.
- 316 Kovacs, C. S. 2017. The Skeleton Is a Storehouse of Mineral That Is Plundered During Lactation and  
317 (Fully?) Replenished Afterwards. *J. Bone. Miner. Res.* 32:676-680.
- 318 Lefebvre, H. P., D. Olivier, T. Catherine, and J. P. Braun. 2008. Fractional excretion tests: a critical  
319 review of methods and applications in domestic animals. *Vet. Clin. Pathol.* 37:4-20.
- 320 Lindgren, U, and H. F. DeLuca 1982. Role of Parathyroid Hormone and 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in  
321 the Development of Osteopenia in Oophorectomized. Rats. *Calcif. Tissue. Int.* 34:510-514.
- 322 Lippolis, J. D., T. A. Reinhardt, R. A. Sacco, B. J. Nonnecke and C. D. Nelson, 2011. Treatment of an  
323 intramammary bacterial infection with 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Plos One*, 3,  
324 doi:10.1371/journal.pone.0025479.
- 325 MacLaughlin, J. A., R. R. Anderson, and M. F. Holick. 1982. Spectral character of sunlight modulates  
326 photosynthesis of previtamin D<sub>3</sub> and its photoisomers in human skin. *Science* 216:1001–1003.
- 327 Martinez, N., R. M. Rodney, E. Block, L. L. Hernandez, C. D. Nelson, I. J. Lean, and J. E. P. Santos.  
328 2018. Effects of prepartum dietary cation-anion difference and source of vitamin D on dairy cows:  
329 Lactation performance and energy metabolism. *J. Dairy Sci.* 101:2544-2562.
- 330 McGrath, J., D. Savage, J. Nolan and R. Elliott. 2012. Phosphorus and calcium retention in steers fed  
331 a roughage diet is influenced by dietary 25OHvitamin D. *Anim Prod Sci.* 52:636–640.
- 332 Nelson, C. D., J. D. Lippolis, T. A. Reinhardt, R. E. Sacco, J. L. Powell, M. E. Drewnoski, M. O’Neil,  
333 D. C. Beitz, and W. P. Weiss. 2016. Vitamin D status of dairy cattle: Outcomes of current practices  
334 in the dairy industry. *J. Dairy Sci.* 99: 10150-10160.
- 335 Nelson, C. D., K. E. Merriman, M. B. Poindexter, M. F. Kweh, and L. P. Blakely. 2018. Symposium  
336 review: Targeting antimicrobial defenses of the udder through an intrinsic cellular pathway. *J.*  
337 *Dairy Sci.* 101:2753-2761.
- 338 Nelson, C. D., T. A. Reinhardt, D. C. Beitz, and J. D. Lippolis. 2010. In vivo activation of the intracrine  
339 vitamin D pathway in innate immune cells and mammary tissue during a bacterial infection. *Plos*  
340 *One*, 5, 2010, doi:10.1371/journal.pone.0015469.
- 341 Nelson, C. D., T. A., Reinhardt, J. D., Lippolis, R. E., Sacco, and B. J. Nonnecke, 2012. Vitamin D  
342 Signaling in the Bovine Immune System: A Model for Understanding Human Vitamin D Req.  
343 *Nut.* 4:181-196.
- 344 NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- 345 Pansu, D., C. Rocher, and F. Bronner. 1983. Duodenal and ileal calcium absorption in the rat and  
346 effects of vitamin D. *Am. J. Physiol.* 244:695–700.
- 347 Peacock, M. 2010. Calcium metabolism in health and disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 5:23-30.
- 348 Rivera, J. D., S. E. Bachman, M. E. Hubbert, M. E. Branine, R. L. Horst, S. N. Williams, and M. L.  
349 Galyean. 2005. Serum and tissue concentrations of vitamin D metabolites in beef heifers after  
350 buccal dosing of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J. Dairy Sci.* 88:1364–1369.
- 351 Rizzoli, R., C. Stoermann, P. Ammann, and J. P. Bonjour. 1994. Hypercalcemia and hyperosteolysis  
352 in vitamin D intoxication: effects of clodronate therapy. *Bone*, 15:193-198.
- 353 Rodney, R. M., P. Celi, J. J. McGrath, H. M. Golder, S. T. Anderson, D. M. McNeill, D. R. Fraser,  
354 and I. J. Lean. 2018a. Metabolic and production responses to calcidiol treatment in mid-lactation  
355 dairy cows. *Anim Prod Sci.* 59:449-460.
- 356 Rodney, R., N. Martinez, E. Block, L. L. Fernandez, C. D. Nelson, P. Celli, J. E. P. Santos, and I. J.  
357 Lean. 2018b. Effects of prepartum dietary cation-anion difference and source of vitamin D on  
358 dairy cows: Vitamin D, mineral and bone metabolism. *J. Dairy Sci.* 101:2519-2254.
- 359 SAS Institute. 2011. SAS/STAT 9.3 User’s Guide. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- 360 Selby, P. L., M. Davles, J. S. Marksm, and E. B. Mawer. 1995. Vitamin D intoxication causes  
361 hypercalcaemia by increased bone resorption which responds to pamidronate. *Clin. Endocrinol.*  
362 43:531-536



- 363 Sommerfeldt, J. L., J. L. Napoli, E. T. Littledike, D. C. Beitz, and R. L. Horst. 1983. Metabolism of  
364 orally administered ergocalciferol and cholecalciferol by dairy calves. *J.Nutrit.* 113: 2595-2600.
- 365 Van Soest, P.J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent  
366 fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597.

**TABLES AND FIGURES**

367  
368

369 Table 1. Composition of the experimental basal diet.

	% of dry matter
Corn silage	45.0
Oat hay	4.0
Whole cottonseeds	8.3
Finely ground mature corn	14.0
Citrus pulp	8.1
Soybean meal	13.5
Low rumen degradable soybean meal (Soypass)	4.0
Premix <sup>1</sup>	3.1
Crude protein	15.1
Neutral detergent fiber	37.4
Ether extract	4.5
Ash	5.5
Non-fiber carbohydrates <sup>2</sup>	36.7
Starch	33.8
Ca	0.77
P	0.46
DM, % of as-fed	52.0

370 <sup>1</sup> 11.86% of Ca (analyzed); 3.93% of P (analyzed); 3.80% Mg; 5.0% K; 1.5% S; 10.6% Na; 7.4% Cl;  
371 11.5 mg/kg Co; 417 mg/kg Cu; 1165 mg/kg Mn; 2330 mg/kg Zn; 15 mg/kg Se; 17.5 mg/kg I; 116,666  
372 UI/kg Vit. A; 33,333 UI/kg Vit. D; and 833 UI/kg Vit. E.

373 <sup>2</sup>NFC = 100 - (CP + NDF + EE + Ash).

374 Table 2. Concentration of Ca and P (Mean  $\pm$  SD) in feeds, orts, feces, urine, and milk of cows with physiological (Phy) or supraphysiological  
 375 (Supra) blood concentrations of 25(OH)D on weeks 4 and 12.

	Week 4				Week 12			
	Ca		P		Ca		P	
	Phy	Supra	Phy	Supra	Phy	Supra	Phy	Supra
Feeds, % of DM								
Corn silage	0.213		0.182		0.225		0.221	
Oat hay	0.235		0.167		0.388		0.152	
Whole cottonseeds	0.108		0.623		0.114		0.631	
Finely ground corn	0.028		0.270		0.027		0.260	
Citrus pulp	1.999		0.173		1.902		0.154	
Soybean meal (SBM)	0.279		0.721		0.365		0.724	
Low RDP SBM <sup>1</sup>	0.389		0.760		0.382		0.736	
Premix	11.791		4.008		11.933		3.868	
Orts, % of DM	0.90 $\pm$ 0.071	0.92 $\pm$ 0.091	0.39 $\pm$ 0.036	0.41 $\pm$ 0.027	0.83 $\pm$ 0.075	0.84 $\pm$ 0.050	0.38 $\pm$ 0.03	0.38 $\pm$ 0.030
Feces, % of DM	1.73 $\pm$ 0.219	1.77 $\pm$ 0.247	0.83 $\pm$ 0.087	0.82 $\pm$ 0.112	1.72 $\pm$ 0.124	1.75 $\pm$ 0.178	0.76 $\pm$ 0.09	0.78 $\pm$ 0.111
Urine, g/kg fresh	0.02 $\pm$ 0.010	0.02 $\pm$ 0.015			0.01 $\pm$ 0.005	0.03 $\pm$ 0.017		
Milk, g/kg fresh	1.11 $\pm$ 0.090	1.09 $\pm$ 0.160	0.84 $\pm$ 0.167	0.78 $\pm$ 0.161	1.05 $\pm$ 0.142	1.00 $\pm$ 0.096	0.99 $\pm$ 0.195	0.92 $\pm$ 0.172

376 <sup>1</sup>Low rumen degradable soybean meal (Soypass).

377 Table 3. Concentrations of plasma 25(OH)D and serum osteocalcin (OC), bone alkaline phosphatase  
 378 (BAP) and C-terminal telopeptide of type 1 collagen (CTX-1) on cows with physiological (Phy) or  
 379 supraphysiological (Supra) blood concentrations of 25(OH)D on days 28 and 84.

	25(OH)D				SEM	<i>P</i> -value		
	Phy		Supra			Vit D	Day	Int <sup>1</sup>
	D 28	D 84	D 28	D 84				
25(OH)D, ng/mL	54.0 <sup>c</sup>	51.2 <sup>c</sup>	99.3 <sup>b</sup>	135.6 <sup>a</sup>	3.63	< 0.01	< 0.01	< 0.01
OC, ng/mL	9.4 <sup>a</sup>	5.3 <sup>b</sup>	9.7 <sup>a</sup>	2.8 <sup>c</sup>	0.86	0.14	< 0.01	0.10
BAP, U/L <sup>2</sup>	18.5 <sup>c</sup>	31.6 <sup>a</sup>	21.6 <sup>bc</sup>	25.3 <sup>b</sup>	2.48	0.38	< 0.01	0.05
CTX-1, ng/mL	0.41	0.38	0.56	0.47	0.651	0.24	0.15	0.50

380 <sup>a, b, c</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly ( $P \leq 0.05$ ).

381 <sup>1</sup>Interaction of vitamin D level and day of sampling.

382 <sup>2</sup>Atomic mass unit (U) per liter of blood (L).

383 Table 4. Serum concentrations of Mg, ionized Ca, total Ca, and P on cows with physiological (Phy) or  
 384 supraphysiological (Supra) blood concentrations of 25(OH)D.

	25(OH)D			<i>P</i> -value <sup>1</sup>	
	Phy	Supra	SEM	Vit D	Int <sup>2</sup>
Mg, <sup>1</sup> mg/dL	2.37	2.32	0.041	0.27	0.57
Ionized Ca, <sup>1</sup> mg/dL	4.93	5.05	0.033	0.01	0.05
Total Ca, <sup>1</sup> mg/dL	9.10	9.29	0.059	0.03	0.03
P, <sup>1</sup> mg/dL	6.33	6.40	0.139	0.75	0.16

385 <sup>1</sup>*P* ≤ 0.01 for the fixed effect of day (28, 56, and 84).

386 <sup>2</sup>Interaction of vitamin D level and day of sampling.

387 Table 5. Glomerular filtration rate (GFR), Ca and P balance, and the fractional excretion rate of Ca (kER) on cows with physiological (Phy) or  
 388 supraphysiological (Supra) blood concentrations of 25(OH)D on weeks 4 and 12.

	25(OH)D				SEM	P-value		
	Phy		Supra			Vit D	Week	Int <sup>1</sup>
	W 4	W 12	W 4	W 12				
GFR, mL/min	592	508	563	513	4509	0.82	0.07	0.63
	Calcium							
Intake, g/d	162.77	180.64	171.38	188.03	7.580	0.40	< 0.01	0.90
Fecal, g/d	104.52	127.90	111.92	142.11	6.915	0.19	< 0.01	0.54
Urinary, g/d	0.39 <sup>bc</sup>	0.27 <sup>c</sup>	0.45 <sup>ab</sup>	0.59 <sup>a</sup>	0.079	0.02	0.92	0.07
Milk, g/d	34.57	30.61	34.35	29.73	2.336	0.74	< 0.01	0.76
Retention, g/d	23.28	21.87	23.73	15.29	7.866	0.75	0.39	0.53
Fecal, % of intake	64.58	71.76	66.46	76.19	3.845	0.49	< 0.01	0.65
Urinary, % of intake	0.26 <sup>a</sup>	0.15 <sup>b</sup>	0.26 <sup>a</sup>	0.30 <sup>a</sup>	0.045	0.11	0.36	0.09
Milk, % of intake	21.66	17.70	20.27	16.39	1.492	0.46	< 0.01	0.89
Retention, % of intake	13.49	10.38	12.46	7.10	4.454	0.69	0.19	0.72
kER, %/minute	0.18 <sup>c</sup>	0.11 <sup>b</sup>	0.21 <sup>c</sup>	0.28 <sup>a</sup>	0.042	0.05	0.99	0.07
	Phosphorus							
Intake, g/d	100.37	105.16	104.21	109.72	4.390	0.45	0.07	0.90
Fecal, g/d	50.32	56.14	52.28	63.33	3.308	0.22	0.01	0.37
Milk, g/d	25.40	28.77	24.92	24.80	2.380	0.16	0.01	0.49
Retention, g/d	24.65	20.26	26.59	21.17	4.076	0.74	0.01	0.89
Fecal, % of intake	50.24	54.02	50.85	58.15	2.794	0.45	< 0.01	0.48
Milk, % of intake	25.72	28.19	24.08	23.02	2.199	0.11	0.75	0.42
Retention, % of intake	24.04	17.79	24.99	18.60	3.583	0.82	0.08	0.99

389 <sup>a,b,c</sup> Means in the same row with different superscripts differ significantly ( $P \leq 0.10$ ).

390 <sup>1</sup>Interaction of vitamin D level and week of sampling.

391 Table 6. Bone optical density (mm Al) of cows with physiological (Phy) or  
 392 supraphysiological (Supra) blood concentrations of 25(OH)D.

	25(OH)D		SEM	<i>P</i> -value
	Phy	Supra		
Accessory carpal	16.64	14.35	1.106	0.09
Lateral cortex of metacarpal	33.91	31.34	2.216	0.28
Medial cortex of metacarpal	32.26	28.11	2.435	0.16
Medullar region of metacarpal	23.05	17.95	2.423	0.07

393

394 Table 7. Dry matter intake (DMI), lactation performance, linear somatic cell count (Linear  
 395 SCC), milk urea-N (MUN), feed efficiency, body weight (BW), body condition score (BCS),  
 396 and the total apparent digestibility of dry matter (DMD) and organic matter (DMO) on cows  
 397 with physiological (Phy) or supraphysiological (Supra) blood concentrations of 25(OH)D.

	25(OH)D		SEM	P-value <sup>1</sup>	
	Phy	Supra		Vit D	Int <sup>2</sup>
DMI, <sup>3</sup> kg/d	22.9	23.1	0.49	0.73	0.96
Milk, <sup>3</sup> kg/d	30.9	31.6	0.43	< 0.01	0.91
ECM, <sup>4,5</sup> kg/d	29.2	29.4	0.71	0.77	0.99
Fat, <sup>4</sup> kg/d	1.028	1.061	0.0465	0.59	0.61
Fat, <sup>4</sup> %	3.34	3.44	0.063	0.07	0.48
Protein, <sup>4</sup> kg/d	1.022	1.007	0.0374	0.69	0.87
Protein, <sup>4</sup> %	3.34	3.28	0.025	0.09	0.97
Lactose, <sup>4</sup> kg/d	1.398	1.421	0.0282	0.49	0.57
Lactose, <sup>4</sup> %	4.49	4.50	0.022	0.69	0.99
Solids, <sup>4</sup> kg/d	3.748	3.771	0.0753	0.73	0.74
Solids, <sup>4</sup> %	12.34	12.01	0.150	0.28	0.94
Linear SCC, <sup>4,6</sup> 0 to 9	3.07	2.74	0.141	0.02	0.40
MUN, <sup>4</sup> mg/dL	15.91	15.67	0.358	0.51	0.97
Milk/DMI <sup>3</sup>	1.38	1.38	0.031	0.73	0.55
ECM/DMI <sup>4</sup>	1.30	1.28	0.035	0.76	0.99
BW, <sup>7</sup> kg	664	668	2.5	0.45	0.84
BW gain, <sup>8</sup> g/d	400	457	53.1	0.41	
BCS, <sup>7</sup> 1 to 5	3.12	3.13	0.040	0.88	0.26
DMD, <sup>9</sup> % of intake	69.1	68.7	0.65	0.67	0.98
OMD, <sup>9</sup> % of intake	72.5	72.1	0.57	0.58	0.71

398 <sup>1</sup> $P < 0.01$  for the fixed effect of day (1 to 84) or week (1 to 12).

399 <sup>2</sup>Interaction of vitamin D level and day or week of sampling.

400 <sup>3</sup>Data obtained daily.

401 <sup>4</sup>Data obtained weekly.

402 <sup>5</sup>Energy corrected milk.

403 <sup>6</sup>Equivalency of the linear SCC: 3.07 = 105,000 cells/mL and 2.74 = 83,500 cells/mL.

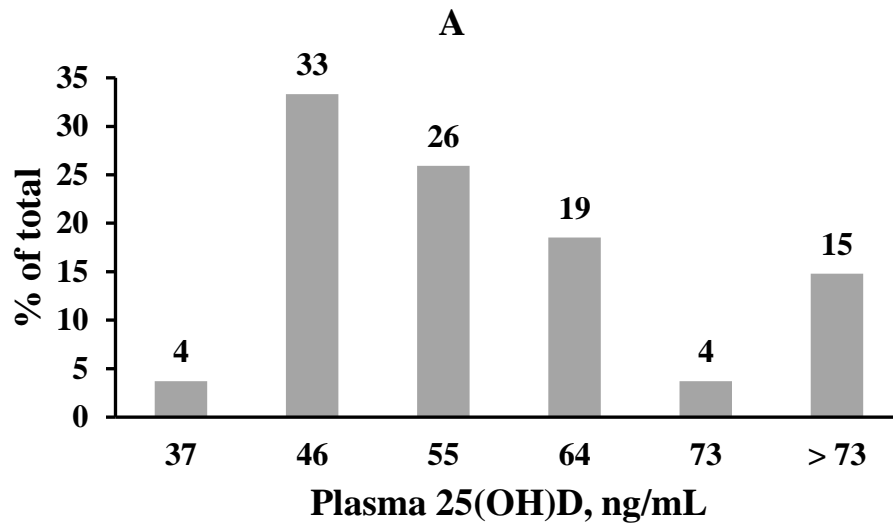
404 <sup>7</sup>Data obtained at 14-d intervals.

405 <sup>8</sup>Slope of the linear regression of BW over days 0, 14, 28, 42, 56, 70, and 84.

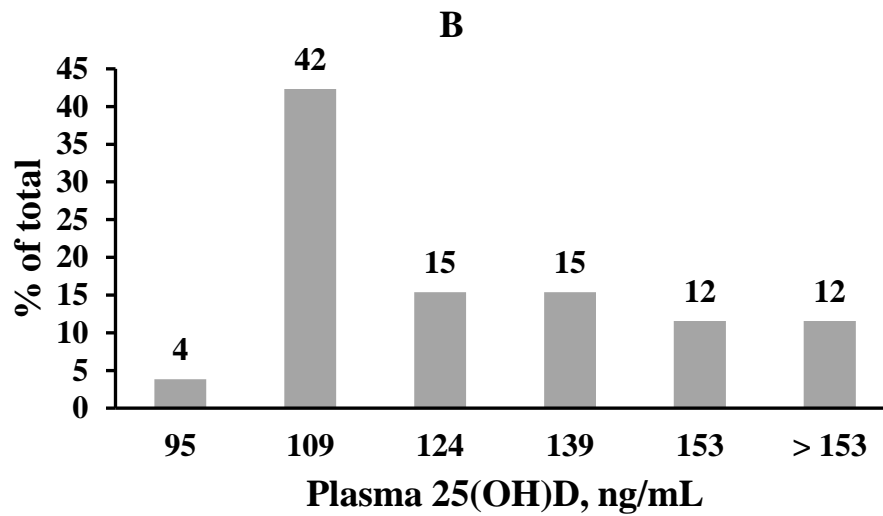
406 <sup>9</sup>Data obtained on weeks 4 and 12.



407

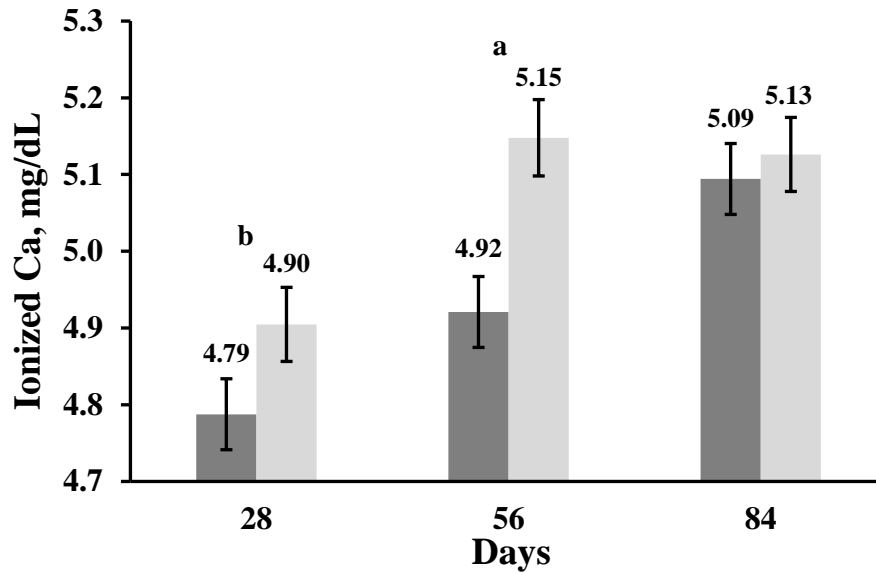


408



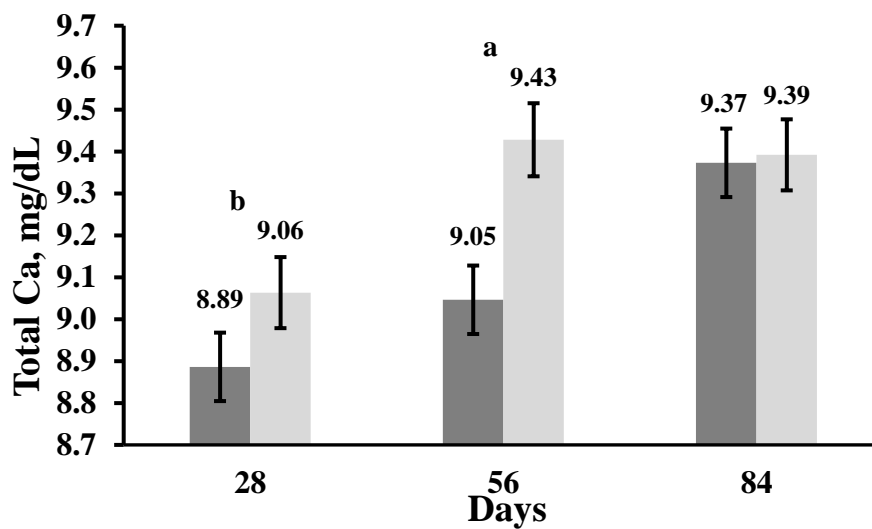
409

410 Figure 1: Distribution of cows with physiological (Phy) (A) and supraphysiological (Supra)  
 411 (B) blood concentrations of 25(OH)D on days 28 and 84 (15 cows sampled twice on each  
 412 vitamin D level).



413  
414  
415  
416  
417

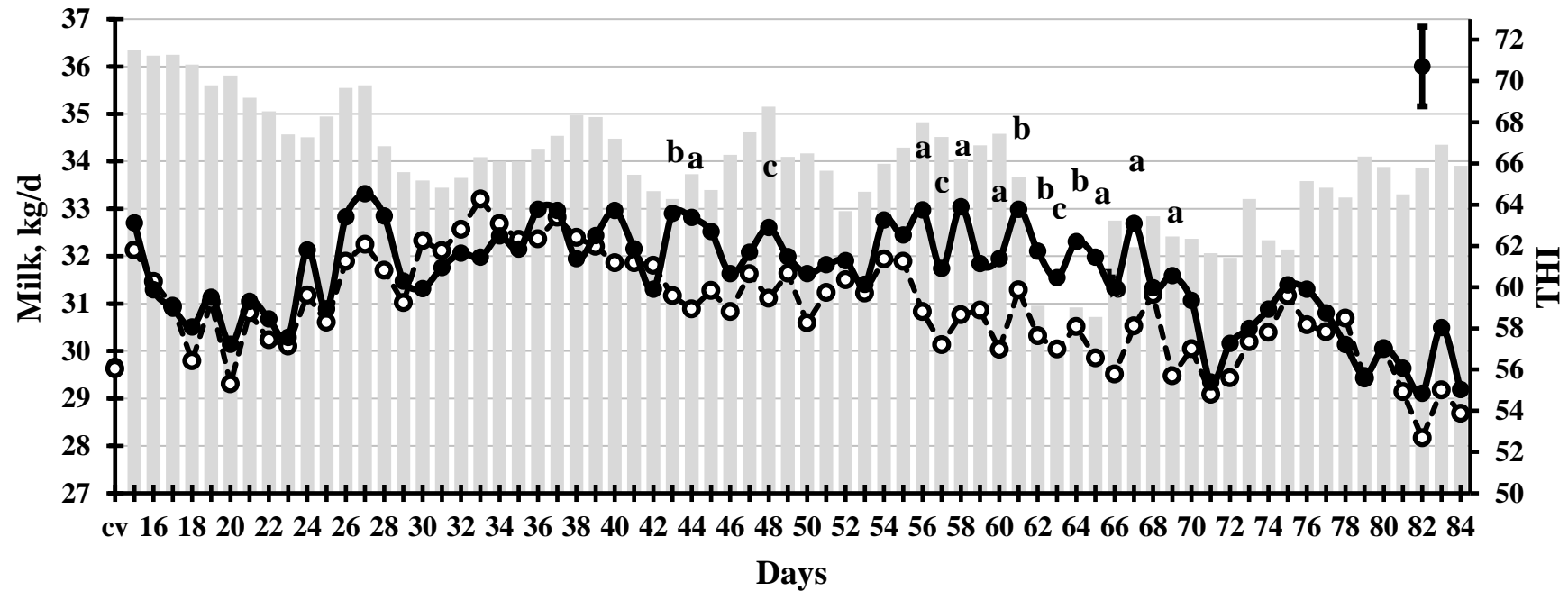
Figure 2. Concentration of ionized calcium in serum on treatment Phy (■) and Supra (□). *P*-value: 0.01 for treatment, < 0.01 for day, and 0.05 for the interaction of treatment and day. Slice option of SAS: <sup>a</sup>*P* ≤ 0.01, <sup>b</sup>*P* = 0.08.



418  
419  
420  
421

Figure 3. Concentration of total Ca in serum on treatment Phy (■) and Supra (□). *P*-value: 0.03 for treatment, < 0.01 for day, and 0.03 for the interaction of treatment and day. Slice option of SAS: <sup>a</sup>*P* ≤ 0.01, <sup>b</sup>*P* = 0.14.

422



423

424 Figure 4. Daily milk yield of cows with Physiological (Phy) (---○---) and Supraphysiological (Supra) (—●—) plasma concentration of 25(OH)D  
 425 and the mean daily Temperature-Humidity Index (THI) inside the barn (■). *P*-values: < 0.01 for Vit D, < 0.01 for day, and 0.91 for the interaction  
 426 of Vit D and day. cv = covariate (*P* = 0.95). Slice option of SAS: <sup>a</sup>*P* ≤ 0.05, <sup>b</sup>*P* ≤ 0.10 and <sup>c</sup>*P* ≤ 0.15.