



LUCIO VINICIUS DREHMER

**ESTÁGIO EM PESQUISA EM NUTRIÇÃO DE VACAS LEITEIRAS
NA UNIVERSIDADE DA FLÓRIDA**

LAVRAS-MG

2021

LUCIO VINICIUS DREHMER

**ESTÁGIO EM PESQUISA EM NUTRIÇÃO DE VACAS LEITEIRAS NA
UNIVERSIDADE DA FLORIDA.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Lavras, como parte
das exigências do Curso de Zootecnia, para a
obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira
Orientador

**LAVRAS - MG
2021**

LUCIO VINICIUS DREHMER

**ESTÁGIO EM PESQUISA EM NUTRIÇÃO DE VACAS LEITEIRAS NA
UNIVERSIDADE DA FLÓRIDA**

**RESEARCH INTERNSHIP IN DAIRY COWS NUTRITION AT THE UNIVERSITY
OF FLORIDA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Lavras, como parte
das exigências do Curso de Zootecnia, para a
obtenção do título de Bacharel.

Dr. Marcos Neves Pereira	UFLA
MSc. Wesley de Rezende Silva	UFLA
MSc. Lucas Carneiro de Resende	UFLA

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira
Orientador

**LAVRAS - MG
2021**

RESUMO

Este trabalho de conclusão de curso é referente ao estágio realizado na Universidade da Flórida nos Estados Unidos, que teve duração de 15 de fevereiro até 15 de maio de 2020. O estágio foi realizado junto ao departamento de Animal Science, sob a orientação do Professor Doutor Corwin Nelson, que atua em pesquisas relacionadas aos efeitos de vitamina D sobre o desempenho e metabolismo de bovinos leiteiros. As atividades desenvolvidas foram relacionadas ao experimento de pesquisa que teve como objetivo avaliar os efeitos do uso de dieta aniônica no parto e suplementação de calcidiol (CA) desde o nascimento, na produtividade e imunidade de vacas leiteiras nulíparas. O experimento foi conduzido na fazenda experimental da universidade, as principais atividades foram relacionadas a alimentação das vacas, acompanhamento dos partos, coletas de sangue, fezes, urina, leite e alimentos, análise laboratoriais e reuniões com o grupo de estudos para discussão de temas relacionados as pesquisas desenvolvidas pelo grupo. O experimento teve a parte de campo com os animais concluída, restando apenas as análises e interpretação de dados. Desta forma, neste trabalho serão apresentados apenas dados parciais sobre a parte de desempenho lactacional. No estágio realizado foi possível acompanhar um dos principais grupos de pesquisas nesta área de atuação, participar na condução de um experimento relevante no meio científico atual, ter contato com outros idiomas e aprender mais sobre fazendas de leite nos Estados Unidos, sendo assim, uma experiência ímpar e que contribuiu muito para minha formação acadêmica.

ABSTRACT

This course conclusion work refers to an internship held at the University of Florida in the United States, which lasted from February 15 to May 15, 2020. The internship was carried out with the Animal Science department, under the guidance of the Professor Doctor Corwin Nelson, who works in research related to the effects of vitamin D on the performance and metabolism of dairy cattle. The activities developed were related to the research experiment that aimed to evaluate the effects of using an acidogenic prepartum diet and calcidiol (CA) supplementation since birth, on the productivity and immunity of nulliparous dairy cows. The experiment was conducted at the university's experimental farm, the main activities were related to feeding cows, monitoring cow birth, blood, feces, urine, milk and food sampling, laboratory analysis and meetings with the study group to discuss related topics in the researches carried out by the group. The experiment had the farm part with the animals completed, leaving only the analysis and data interpretation. Thus, in this work only partial data on lactational performance will be presented. During the internship, it was possible to accompany one of the main research groups in this area, participate in a research experiment of great relevance in the current scientific environment, have contact with other languages and learn more about dairy farms in the United States, a unique experience that contributed a lot to my academic formation

Key words: Calcidiol, Acidogenic Diets, Transition Period.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cronograma de coletas do experimento.....	19
Figura 2 – <i>Free stall</i> utilizado para alojamento das novilhas pré parto.	21
Figura 3 – Sala de ordenha.....	22
Figura 4 – Novilhas sendo treinadas a fazer uso do <i>calan gate</i>	23
Figura 5 – Monitoramento do parto.....	24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	REFERENCIAL TEÓRICO	8
2.1	Período de transição.....	9
2.2	Hipocacemia.....	10
2.3	Dietas aniônicas	11
2.4	Vitamina D	13
2.5	Efeitos do uso no pré parto de dietas cátió-aniônicas e fontes de vitamina D sobre vacas em lactação.....	15
2.5.1	Desempenho da lactação e metabolismo energético.....	16
2.5.2	Vitamina D e minerais.....	17
3	DESCRIÇÃO DO EXPERIEMNTO.....	18
3.1	Hipótese.....	18
3.2	Objetivo.....	18
3.3	Material e métodos	18
3.4	Resultados parciais do experimento	21
4	DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO	22
4.1	Descrição da fazenda.....	22
4.2	Descrição da atividades.....	19
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
6	REFERÊNCIAS	25

1. INTRODUÇÃO

A medida em que ocorreu a seleção e conseqüentemente o melhoramento genético de vacas holandesas ao longo dos últimos anos, observou-se grandes ganhos em produção de leite e de sólidos totais do leite. No entanto, a intensa pressão de seleção para estas características resultou em piora das características relacionadas com saúde e reprodução, que são determinantes para que os animais alcancem seu pleno potencial de produção e tenha longevidade. Desta forma, a indústria e os grupos de pesquisas buscam desenvolver produtos, aditivos e até mesmo técnicas que possam auxiliar na melhoria da saúde, reprodução e longevidade das vacas.

O início da lactação é o momento mais delicado para vacas leiteiras, sendo que nesta fase, além do balanço energético negativo que acomete esses animais, existe um grande desafio relacionado ao metabolismo do cálcio, que se encontra em baixos níveis plasmáticos devido ao processo do parto, e a grande excreção desse mineral no leite (Wilkens et al., 2020). O ponto determinante para o sucesso da lactação está relacionado aos eventos associados ao período de transição, sabemos que neste período o principal desafio está relacionado ao metabolismo do cálcio, que tem papel importante atuando como segundo mensageiro em funções imunes e endócrinas em vacas em torno do parto (Goff et al., 2008). Distúrbios nos sistemas endócrino e imune são conhecidos como pontos chave para o desenvolvimento de doenças e desordens metabólicas neste período (Wilkens et al., 2020). Neste contexto, o uso de dietas acidogênicas e a suplementação de CA possuem efeitos positivos sobre o metabolismo de cálcio, e como consequência sobre o desempenho na lactação, saúde e reprodução de vacas leiteiras (Martinez et al., 2018b; Rodney et al., 2018).

Em recente meta análise, Santos et al. (2019) analisaram os efeitos em saúde e reprodução de vacas com uso de dietas com diferença cátion-aniônica (DCAD) negativa, sendo observado aumento na produção de leite corrigido para gordura (LCG), consumo de matéria seca (CMS), redução da incidência de febre do leite, metrite e retenção de placenta em vacas múltíparas. Nesse mesmo estudo, foi avaliado o efeito dessas estratégias nutricionais sobre o desempenho de nulíparas, em que não foram encontradas diferenças em produção de leite e de sólidos, com menor CMS no pós parto para nulíparas do grupo DCAD negativo, que conseqüentemente tiveram menor eficiência alimentar quando alimentadas com dietas acidogênicas (Santos et al., 2019).

A suplementação de CA tem sido investigada como forma de melhorar o desempenho da lactação, tendo em vista que a vitamina D está fortemente associada a homeostase do cálcio.

No trabalho de Martinez et al. (2018a), a suplementação de CA aumentou a produção de LCG e leite corrigido para energia (LCE), sendo que as maiores produções de leite foram nas vacas suplementadas com CA e que consumiram dietas de DCAD negativo. Vacas suplementadas com CA tiveram menor incidência de retenção de placenta e metrite, resultados que associados ao melhor status imune mensurado através da atividade dos neutrófilos. Aparentemente a combinação da suplementação de CA com DCAD negativo reduz a incidência de doenças no pós parto (Rodney et al., 2018).

As atividades principais do estágio foram relacionadas a um experimento de pesquisa que teve como objetivo que avaliar os efeitos do uso de dieta acidogênica no pré parto e suplementação de CA desde o nascimento, sobre a produtividade e imunidade de vacas leiteiras nulíparas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Período de transição

O período de transição é classificado como sendo o intervalo de 21 dias antes do parto até 21 dias depois do parto. Nesse período ocorrem grandes alterações fisiológicas, metabólicas, nutricionais e de manejo, e a vaca deixa de ser gestante e dando início a lactação. Este período é marcado por ser bastante desafiador, especialmente para vacas de alta produção que possuem grande secreção de nutrientes via glândula mamária, o que gera grande demanda de nutrientes que devem ser adequadamente fornecidos no período pós parto. Existe grande redução de CMS neste período, causando distúrbios metabólicos como o balanço energético negativo que ocorre devido ao rápido aumento na demanda de nutrientes no momento em que o CMS é baixo, impossibilitando atender a demanda energética do animal (Drackley, 1999).

Outro desafio logo após o parto está relacionado a deficiência de minerais para o animal, sendo o cálcio o principal dentre os minerais que se encontra em baixos níveis séricos especialmente no momento do parto (Horst et al., 1994). O cálcio é excretado no colostro de maneira muito intensa e também tem função relacionada as contrações musculares inerentes ao processo de parto, fazendo com que os níveis plasmáticos de cálcio nesta fase sejam fortemente reduzidos, causando distúrbios metabólicos intensos como a hipocalcemia clínica, conhecida como febre do leite. Ocorrem também distúrbios mais moderados como a hipocalcemia subclínica, porém, mesmo que moderado está associada a outros distúrbios como metrite, mastite entre outros (Martinez et al., 2016). O cálcio também está relacionado a

diversas funções imunes que estão associadas com o combate de doenças como metrite e mastite acima citadas (Martinez et al., 2018b).

A adoção de estratégias como o uso de dietas aniônicas tem funcionado como forma de reduzir os casos de hipocalcemia clínica e subclínica, no entanto ainda existe forte prevalência de hipocalcemia subclínica nos rebanhos (Reinhardt et al., 2011). A hipocalcemia subclínica é definida quando diagnosticada a concentração de cálcio no sangue menor do que 8,59 mg/dL (Martinez et al., 2012). Segundo Wilkens et al. (2020) os mecanismos de regulação da homeostase do cálcio são ativados durante os períodos de baixa concentração de cálcio, e as formas de reduzir a hipocalcemia subclínica são através da suplementação enteral e parenteral de cálcio, uso de diferentes fontes de vitamina D e uso de dietas aniônicas.

2.2 Hipocalcemia

Durante o período de transição, ocorre uma forte mudança da demanda de cálcio para produção de colostro, se o metabolismo da vaca não consegue se adaptar rápido o suficiente a essa mudança ocorre o quadro de hipocalcemia clínica. A concentração plasmática de cálcio nessa condição pode estar baixo de 5,5 mg/L, os sintomas clínicos estão relacionados a falta de coordenação motora, orelhas e nariz secos, progredindo para incapacidade de se manter em pé, aumento dos batimentos cardíacos, redução da motilidade intestinal e redução da temperatura corporal (Horst et al., 2005).

O tratamento geralmente é na forma de borogluconato de cálcio, para fornecimento de 8 a 10 gramas de cálcio para suporte até que os mecanismos intestinais e ósseos de transporte de cálcio voltem ao seu funcionamento. Se o quadro clínico não for tratado 60 a 70 % dos animais acometidos podem morrer. Uma vaca que produz 10 litros de colostro perde 23 gramas de cálcio, que representa 9 vezes a sua concentração plasmática (Horst et al., 2005).

A hipocalcemia pode se apresentar também na forma subclínica, que ocorre logo nos primeiros dias após o parto (Reinhardt et al., 2011). Os motivos pelo qual este distúrbio ocorre estão relacionados a intensa mobilização de cálcio que é secretada pelo colostro e pela falta de condição que a vaca tem de mobilização de cálcio do tecido ósseo e absorção pelo intestino logo após o parto, da mesma forma que ocorre para hipocalcemia clínica (Goff., 2008). Segundo Reinhardt et al. (2011), a incidência de hipocalcemia aumenta de acordo com o número de lactações, sendo de 25%, 41%, 49%, 51%, 54% e 42% para primeira até sexta lactação, respectivamente. O que está relacionado com a maior capacidade de animais mais jovens a mobilizar cálcio de seu organismo (Horst et al., 2005).

Segundo Goff et al. (1991), muitas vacas nas primeiras semanas de lactação apresentam balanço negativo de cálcio por que as perdas de cálcio via glândula mamária, urina, fezes e perdas endógenas são maiores do que é capacidade de absorção desse mineral oriundo da dieta. Isso por que os mecanismos responsáveis pela absorção de cálcio do intestino ainda não estão totalmente adaptados nesse período, desta forma, para manter os níveis plasmáticos de cálcio, ocorre a reabsorção do cálcio presente no tecido ósseo, nos rins e absorção do cálcio intestinal. Os processos de adaptação dos mecanismos de absorção de cálcio começam a melhorar quando ocorre o aumento dos níveis plasmáticos de paratormônio (PTH) e 1,25(OH)₂D. A produção de PTH e 1,25(OH)₂D é ocorre normalmente mesmo em vacas com febre do leite, porém os locais de ação dos hormônios (rins, ossos e o intestino) perdem sua capacidade responsiva (Goff e Horst., 1997b).

Martinez et al. (2012) definiram como hipocalcemia subclínica quando as concentrações séricas de cálcio menores que 8,59 mg/dL. Neste trabalho 65% das vacas tiveram concentração de cálcio no soro menor do 8,59 mg/dL em pelo menos 1 dos 3 primeiros dias de lactação, sendo que a prevalência foi similar entre primíparas e múltíparas. Vacas pós parto foram classificadas como normocalcêmicas (cálcio no soro acima de 8,59 mg/dL), e como hipocalcêmicas (cálcio no soro abaixo de 8,59 mg/dL). As hipocalcêmicas tiveram maior incidência de metrite e metrite purpural, maior concentração de betahidroxibutirato (BHBA) e ácidos graxos não esterificados (NEFA), menor concentração de neutrófilos no sangue e maior idade a concepção. Sugerindo assim, maior lipomobilização e redução da função netrofílica, que ocasionou aumento no risco de doenças uterinas (Martinez et al., 2012).

O uso de dietas com DCAD negativo está associado com a menor incidência de febre do leite (Lean et al., 2006). Os autores também relataram que o aumento da concentração de magnésio da dieta reduziu a incidência de febre do leite, por outro lado, maior concentração de potássio e fósforo aumentou incidência de febre do leite. Dietas pré parto com alta concentração de cálcio aumentaram o risco de hipocalcemia, efeito contrário foi observado para dietas de baixo cálcio (Lean et al., 2006).

2.3 Dietas aniônicas

A utilização de dietas aniônicas consiste no fornecimento de uma maior proporção de ânions em relação aos cátions na dieta, sendo os elementos que participam do balanço cátion-aniônico o Cl⁻ e S⁻ (ânions), e o Na⁺ e K⁺ (cátions), constituindo a equação geral do balanço como sendo [(Na + K) - (Cl + S)] (Block, 1984). Existem diferentes equações para calcular o

DCAD, no entanto, a mais aceita e utilizada é a descrita por Block (1984). Dietas com maior concentração de cátions são mais alcalogênicas, ou seja, fazem com que o pH do sangue e da urina sejam mais altos. Dietas com maior concentração de ânions são mais acidogênicas, o que faz com que o pH sanguíneo e urinário diminuam. Dietas aniônicas geram uma leve acidose metabólica compensada, quanto mais acidogênica a dieta, maior é a redução do pH sanguíneo e mais otimizada é a homeostase do cálcio (Goff et al., 2004).

Santos et al. (2019), analisaram os efeitos do uso de dietas com diferentes níveis de DCAD no pré parto, a redução do DCAD aumentou o nível de cálcio no sangue, reduziu o risco de febre do leite, metrite, mastite, e reduziu o número de eventos de doenças em vacas multíparas e nulíparas. Os autores relataram que o fornecimento de dietas com baixo DCAD no pré parto reduziu o CMS nessa fase, no entanto aumentou o CMS no pós parto para multíparas e nulíparas, causando aumento da produção de leite em vacas multíparas, porém não em nulíparas (Santos et al., 2019).

O efeito de aumento do CMS no pós parto para nulíparas e multíparas se deve ao fato da melhora no metabolismo do cálcio que leva a redução da incidência de retenção de placenta, metrite e risco de hipocalcemia, que são fatores conhecidos como redutores de CMS (Martinez et al. 2014). Sobre a redução no CMS que ocorre no pré parto com uso dietas acidogênicas, Zimpel et al. (2018) demonstraram que a redução ocorre devido a acidose metabólica causada pelo DCAD negativo, e não pela baixa palatabilidade dos ânions adicionados a dieta.

Um dos fatores bem conhecidos sobre os distúrbios metabólicos relacionados ao cálcio é que vacas nulíparas são menos propensas a terem problemas dessa natureza no início da lactação (Lean et al., 2006). Animais jovens são mais adaptados a dietas com baixos níveis de cálcio, possuindo desta forma maior eficiência de absorção de cálcio pelo intestino (Horst et al., 2005). Animais mais velhos, especialmente a partir da terceira gestação, tem capacidade reduzida de mobilizar cálcio das reservas ósseas e de ativar o transporte de cálcio intestinal. A mobilização de cálcio dos ossos e absorção desse mineral pelo intestino é influenciada e regulada pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ através da interação com o receptor intracelular (VDR), com o avançar da idade o VDR reduz impedindo as células alvo de serem responsivas ao $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Horst et al., 2005).

Outra abordagem interessante sobre dietas aniônicas, é sobre seus impactos positivos sobre a saúde e reprodução de vacas. Martinez et al. (2012) avaliaram os efeitos da quantidade de cálcio no periparto sobre o risco de desenvolvimento de doenças uterinas, em que observou que vacas com hipocalcemia subclínica, cálcio $\leq 8,59$ mg/dL, tiveram reduzida concentração de neutrófilos no sangue e função dos neutrófilos prejudicada, e observaram aumento da

prevalência de metrite e metrite purpural quando comparadas com vacas normocalcêmicas. Ainda neste trabalho, vacas hipocalcêmicas também apresentaram menor taxa de prenhez e mais dias em aberto. Além disso, a redução do DCAD de 200 para -100 mEq/kg no pré parto reduz o risco de retenção de placenta e metrite que estão fortemente relacionados com melhores desempenhos em saúde e reprodução (Santos et al., 2019).

Os efeitos positivos do uso de DCAD negativo em dietas pré parto já são bem conhecidos como forma de reduzir a incidência de febre do leite, melhorando o metabolismo do cálcio e reduzindo a incidência de hipocalcemia em vacas leiteiras. No entanto, segundo Martinez et al., (2016) a prevalência de hipocalcemia subclínica continua alta nos rebanhos leiteiros, causando efeitos negativos aos animais, como redução do CMS, redução na atividade imune, entre outros fatores negativos que são capazes de explicar o fato de vacas com hipocalcemia subclínica terem mais doenças associadas.

2.4 Vitamina D

A vitamina D é uma vitamina produzida através...Sendo componente fundamental para o crescimento e desempenho dos animais, importante em funções como diferenciação e proliferação celular, ativação do sistema imune inato, além da função já conhecida de homeostase do cálcio e fosforo (Nelson et al., 2012). Bovinos adquirem vitamina D na forma de vitamina D2 através de plantas, e também na forma de vitamina D3 através de síntese endógena pela exposição da pele ao sol através da enzima 7-dihidroxicolesterol (Nelson et al., 2016). As vitaminas D2 e D3 são convertidas para 25-hidroxivitamina D [25(OH)D], que é o melhor indicador do status de vitamina D no soro e no plasma do animal (Nelson et al., 2016). Segundo Horst et al. (1994), a 25-(OH)D3 é a maior forma de vitamina D circulante no corpo, os níveis normais para uma vaca estão entre 20 a 50 ng/ml, sendo que concentrações menores que 5 ng/ml indicam deficiência, e concentrações de 200 a 300 ng/ml indicam intoxicação por excesso de vitamina D.

A vitamina D é um pro-hormônio precursor da produção de 1,25-dihidroxivitamina D que é um hormônio regulador de cálcio no organismo. No fígado, a vitamina D é convertida em 25-hidroxivitamina D, e ao chegar nos rins esse composto é convertido no hormônio 1,25-dihidroxivitamina D. O PTH é o principal regulador dos níveis plasmáticos de cálcio no sangue, estimulando a produção de 1,25-dihidroxivitamina D, que atua na reabsorção de cálcio nos ossos, nos rins e na absorção do cálcio intestinal (NRC, 2001).

O 25(OH)D é o metabolito precursor do hormônio 1,25-dihidroxivitamina D, que atua na regulação da expressão de genes relacionados a ligação e transporte de cálcio, deposição e

retirada de cálcio do osso, além de atuar no sistema imune inato (Nelson et al., 2016). As concentrações de 25(OH)D no soro não estão bem definidas na literatura. Adams e Hewison (2010), relataram que a concentração requerida de 25(OH)D deve ser no mínimo de 30 ng/ml para não causar deficiência de vitamina D. Nelson et al. (2016) relataram que as concentrações naturais de 25(OH)D em bezerros de corte expostos a luz solar sem suplementação de vitamina D estão entre 50 a 60 ng/ml, que segundo os autores são valores maiores do que os anteriormente relatados na literatura como sendo normais para animais criados em condições naturais de exposição solar.

Segundo Wilkens et al. (2020), para vacas que apresentam concentração no soro de 25-hidroxivitamina D de acordo com as indicações atuais (acima de 40 ng/ml), não existem indicativos de que a hipocalcemia pode estar relacionada a suplementação inadequada de vitamina D. Os autores destacam que a concentração de 25-hidroxivitamina D no soro, ideal para promover ótima homeostase do cálcio é desconhecida, no entanto, a maioria das fazendas americanas fornece 1,5 a 2,5 vezes a recomendação do NRC que é de 30.000 UI/kg de peso vivo (NRC, 2001), como forma de garantir a adequada suplementação dessa vitamina.

Em um trabalho realizado por Nelson et al. (2016), foram coletadas amostras de sangue de 702 vacas de 12 rebanhos de diferentes regiões do Estados Unidos para determinar a concentração no soro de 25(OH)D. A quantidade de vitamina D fornecida em 11 das 12 fazendas variou de 30.000 até 50.000 UI/dia, sendo que apenas uma fazenda fornecia apenas 20.000 UI/dia. A concentração média de 25(OH)D no soro de todas as vacas foi de 68 g/mL, com pouca variação entre os rebanhos. O trabalho também tentou correlacionar o tempo de exposição ao sol dos rebanhos com a concentração de 25(OH)D no soro, no entanto não encontrou diferenças significativas. A fazenda que fornecia 20.000 UI/dia teve concentração de 25(OH)D no soro menor do que as outras fazendas, sendo que 22% das vacas que receberam 20.000 UI/dia apresentaram menos de 30 ng/ml de 25(OH)D no soro. No entanto, 95% das vacas que receberam de 30.000 até 50.000 UI/dia apresentaram concentração de 25(OH)D maior que 40 ng/ml (Nelson et al., 2016).

Nelson et al., (2016) encontraram foi a menor concentração de 25(OH)D nas vacas pós parto, de 0 até 30 dias em lactação (DEL), do que nas vacas em meio de lactação, de 100 até 300 DEL, (57 ± 17 vs. 71 ± 20 ng/ml, respectivamente). Os autores destacam que a menor concentração de 25(OH)D no pós parto pode estar relacionado ao aumento no metabolismo do 25(OH)D e diminuição da concentração das proteínas de ligação da vitamina D. Além disso, outro fator relacionado pode ser o menor consumo de vitamina D durante o período seco que pode estender o efeito de redução de níveis de 25(OH)D no início da lactação. Os autores

destacam a necessidade de melhores investigações sobre quais os níveis adequados de fornecimento de vitamina D, uma vez que, existe diferença entre o que é recomendado pelo NRC e o que é utilizado comumente nas fazendas, além de melhores investigações sobre o que pode estar relacionado com a menor concentração de 25(OH)D logo após o parto. A recomendação do NRC para quantidade de vitamina D a ser fornecida na dieta é de 30.000 UI/kg de peso vivo que foi estabelecido previamente pelo NRC, 1989 (National Research Council, 1989).

A ativação da vitamina D₃ é iniciada no fígado para formar a 25-hidroxicoliciferol[25-(OH)D₃], que é a forma circulante mais presente da vitamina D. A 25-(OH)D₃ é hidroxilada nos rins para formar 1,25-dihidroxicoliciferol [1,25-(OH)₂D₃] que é a forma ativa da vitamina D₃ (Goff e Horst., 1997b). O PTH é o mais ativo e importante regulador da homeostase de cálcio plasmático (Deluca. 1984). O PTH é regulado basicamente através do nível de cálcio no plasma, quando a concentração de cálcio fica abaixo de 10 mg/dL a glândula paratireoide é estimulada a produzir PTH, se a concentração de cálcio está acima desse limiar a secreção de PTH é reduzida (Goff e Horst., 1997b).

A adequada suplementação de vitamina D especialmente para vacas leiteiras que estão confinadas durante a lactação e em alguns casos até em seu período seco, e que possuem pouca exposição a luz, é importante para garantir que as funções relacionadas a esta vitamina, em especial a homeostase do cálcio, ocorra de maneira eficiente. Como visto algumas fazendas dos Estados Unidos fornecem mais do que o recomendado pelo NRC, isso provavelmente não aumenta significativamente o custo da dieta e também está muito longe de expor as vacas a algum risco de intoxicação pelo excesso de vitamina D. Uma prática interessante é fazer a medição de 25-hidroxivitamina D nas fazendas que possuem vacas com baixa exposição solar para poder tomar melhores decisões sobre a inclusão de vitamina D.

2.5 Efeitos do uso de dietas com DCAD negativo e fontes de vitamina D no pré parto sobre desempenho de vacas em lactação

Para relatar sobre os efeitos do uso de dietas acidogênicas e CA no pré parto sobre o desempenho de vacas leiteiras, podemos considerar como referência bibliográfica o compêndio de trabalhos realizados por pesquisadores da Universidade da Florida, que envolve os trabalhos de Martinez et al. (2018a), Martinez et al. (2018b) e Rodney et al. (2018). A pesquisa foi realizada com a condução de um experimento em que foram gerados três artigos que apresentam

resultados sobre desempenho de lactação e metabolismo energético (Martinez et al., 2018a), vitamina D, minerais e metabolismo ósseo (Rodney et al., 2018), e sobre saúde e respostas reprodutivas (Martinez et al., 2018b). Neste experimento foram utilizadas 80 vacas holandesas prenhas, 28 nulíparas e 52 múltiparas, os tratamentos consistiram em dois níveis de DCAD, positivo (+130 mEq/Kg) e negativo (-130 mEq/kg) e duas fontes de vitamina D, CA ou colicalciferol (CH) que foram incluídos na proporção de 3 mg para cada 11 kg de CMS e fornecidos dos 252 dias de gestação até o parto. Após o parto, as vacas foram alimentadas com a mesma dieta até os primeiros 49 dias em lactação.

Nos próximos dois tópicos serão apresentados alguns resultados sobre este experimento das partes referentes aos artigos de desempenho da lactação e metabolismo energético (Martinez et al., 2018a), e sobre vitamina D, minerais e metabolismo ósseo (Rodney et al. 2018). Estes dois artigos, Martinez et al. (2018a) e Rodney et al. (2018), serviram de embasamento para a realização do experimento desenvolvido durante o estágio, uma vez que possuem semelhanças na metodologia de condução, análises realizadas e respostas esperadas. As diferenças estão no fato de o experimento realizado durante o estágio ter utilizado apenas nulíparas, em que o grupo tratamento foi suplementado com CA desde o nascimento, e não só apenas no pré parto. Outra diferença foi a duração do experimento, sendo que no experimento dos artigos de Martinez et al. (2018a) e Rodney et al. (2018) a duração foi até 49 DEL, enquanto que no experimento realizado no durante o estágio a duração foi até as vacas completarem 100 DEL.

2.5.1 Desempenho lactacional e metabolismo energético

Sobre os resultados de Martinez et al. (2018a), o fornecimento de CA aumentou a produção de colostro, produção de leite, LCG e LCE. Os aumentos na produção de leite com o uso de CA ocorreram tanto em DCAD positivo quanto negativo, no entanto, o uso de dieta acidogênica teve aumento apenas numérico para produção de leite, LCG e LCE. Quanto aos metabólicos energéticos, vacas alimentadas com DCAD negativo tiveram menor concentração de NEFA. Vacas alimentadas com DCAD positivo tiveram maior concentração de glicose, insulina e IGF-1, os autores destacam que isso se deve ao maior CMS das vacas do tratamento DCAD positivo durante o pós parto. No pós parto os metabólicos energéticos não foram diferentes entre os tratamentos (Martinez et al., 2018a). As vacas que foram alimentadas com DCAD negativo tiveram maiores concentrações de cálcio ionizável e cálcio total no início da lactação, os autores destacam que vacas em dietas acidogênicas, mesmo que tenham menores

concentrações de glicose, insulina e IGF-1, são capazes de reduzir a hipocalcemia o que melhora a produção. Este experimento avaliou respostas aos tratamentos de nulíparas separado das múltiparas. Alimentar nulíparas com DCAD negativo resultou em redução da produção de leite em 1,48 kg/dia (Martinez et al., 2018a).

Ainda sobre trabalho de Martinez et al. (2018a), a utilização de CA reduziu morbidade nas vacas, o que explica em partes a maior produção de leite. Segundo os autores, o aumento da síntese no tecido mamário e aumento do substrato disponível, combinado com o aumento do cálcio disponível nas vacas suplementadas com CA pode ter resultado em maior produção de colostro e de leite. O CA tem tempo de ação maior na circulação do que o CH, o que pode prolongar sua ação mesmo depois do fim da suplementação, além disso, o uso do CA pode manter altos níveis de 25-hidroxivitamina D por até 30 dias mais do que o CH (Rodney et al., 2018).

2.5.2 Vitamina D e minerais

Sobre os resultados de Rodney et al. (2018), a suplementação de CA no pré parto aumentou a concentração plasmática dos metabolitos da vitamina D no pré e pós parto, comparado a suplementação com CH. O fornecimento de dietas acidogênicas para vacas no pré parto reduziu o declínio de Ca ionizável e Ca total após o parto. As vacas alimentadas com dietas acidogênicas tiveram menor concentração de vitamina D3 e 25-hidroxivitamina D3 no plasma, uma das hipóteses é que as vacas alimentadas com dietas acidogênicas, pelo fato de apresentarem menor CMS no pré parto, teriam menor ingestão de CA ou CH resultando em menores níveis plasmáticos dos metabolitos de vitamina D. No entanto, a redução do CMS ocorreu apenas nas vacas múltiparas e não em nulíparas, levantando a hipótese de que a acidose metabólica induzida pela dieta com DCAD negativo pode ter influenciado na absorção ou no metabolismo pós absorptivo dos componentes da vitamina D fornecidos na dieta. Segundo Charbonneau et al. (2006), a acidose metabólica induzida pela dieta acidogênica aumenta a concentração de Ca ionizável em torno do parto, o que pode afetar a produção de PTH e a atividade da 1-alfa-hidroxilase que é responsável pela produção de 1,25-dihidroxivitamina D3.

No trabalho de Rodney et al. (2018), a suplementação de CA aumentou as concentrações de Ca total e P total no pré parto, porém não no pós parto, indicando que a suplementação não foi efetiva em reduzir hipocalcemia pós parto tanto em DCAD negativo quanto positivo. Além disso, a menor concentração de cálcio no soro pós parto para o grupo suplementado com CA em DCAD positivo, pode sugerir efeito negativo da suplementação de CA. A suplementação

de CA em DCAD positivo aumentou as perdas de minerais na urina e no colostro, o que explica as menores concentrações de Ca total Ca ionizável no pós parto (Rodney et al., 2018).

3 DESCRIÇÃO DO EXPERIMENTO

3.1 Hipótese

Fornecer dieta com DCAD negativo combinado com a suplementação de CA desde o nascimento dos animais poderia melhorar o desempenho produtivo e imune em vacas nulíparas.

3.2 Objetivo

Objetivou-se determinar os efeitos do fornecimento de dieta com DCAD negativo combinado com a suplementação de CA desde o nascimento sobre o desempenho lactacional e imunológico de vacas nulíparas.

3.3 Material e métodos

O experimento foi delineado em arranjo fatorial 2×2 com efeitos da fonte de vitamina D e do nível de DCAD. Vacas nulíparas foram blocadas de acordo com a data esperada de parto e o mérito genômico para leite corrigido para energia. Dados de medida repetida dentro da unidade experimental foram analisados utilizando o PROC MIXED do SAS. Os modelos incluíram o efeito fixo do nível de DCAD, fonte de vitamina D, interação entre nível de DCAD e fonte de vitamina D, dia da mensuração, DCAD e dia, vitamina D e dia, DCAD vitamina D e dia. Os efeitos aleatórios foram bloco e vaca dentro do nível de DCAD e vitamina D. Significância estatística foi considerada $P \leq 0,05$, e tendência quando $0,05 < P \leq 0,10$. Foram utilizadas 95 vacas holandesas nulíparas distribuídas a 1 de 4 tratamentos: TRT 1: DCAD -50 mEq/kg + suplementação de CA, TRT 2: DCAD -50 mEq/kg + suplementação de CH (controle), TRT 3: DCAD +200 mEq/kg + suplementação de CA, TRT 4: DCAD +200 mEq/kg + suplementação de CH (controle).

As nulíparas prenhas foram movidas para o galpão de *free stall* com 240 dias de gestação para aclimação ao ambiente e começaram a ser treinadas a usar os portões de alimentação automáticos. Durante o período de pré parto, todas as vacas receberam uma deita comum mais um tratamento *top-dress* de CA (tratamento) ou milho moído (placebo). O suplemento foi preparado através da mistura de CA misturado com milho moído com a intensão de fornecer 1 mg em 100 gramas de mistura. As nulíparas que vinham sendo suplementadas

com CA desde o nascimento recebiam CA durante a fase de criação de forma oral 3 vezes por semana com uso de seringa na concentração de 1,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo. Depois do parto as nulíparas que vinham recebendo CA desde o nascimento continuaram a receber esse tratamento até 100 DEL e o grupo que não foi suplementado desde o nascimento foi considerado grupo controle do experimento, recebendo apenas milho moído no *top-dress*. Todas as vacas pré parto foram alojadas juntas em um *free stall* com cama de areia, e cada vaca foi aleatoriamente designada para um portão de alimentação individual. Imediatamente após o parto as vacas foram movidas para outro lote dentro do mesmo barracão e designadas a um novo portão de alimentação individual baseado na sequência de parto. Os lotes do barracão eram equipados com duas linhas de ventiladores (1 ventilador para 6 metros lineares), sendo uma colocada na linha de cocho e outra na linha de camas. Os aspersores estavam posicionados na linha de cocho e ambos, ventiladores e aspersores, eram acionados quando a temperatura ultrapassava os 18°C.

As vacas foram alimentadas apenas uma vez ao dia durante o pré parto, às 5 h, e duas vezes ao dia no pós parto, 5 e 11 h. A quantidade de alimento fornecida diariamente foi calculada para resultar em 5% de sobras que foram pesadas antes do primeiro trato da manhã. As vacas foram designadas para dois tratamentos -50 mEq/kg de dieta ou a +200mEq/kg de dieta até o parto. Depois do parto, as primíparas receberam dieta pós parto comum até 100 dias de lactação. O consumo de matéria seca foi registrado até o final do experimento.

As amostras das forragens e dos concentrados foram coletados semanalmente, pré secas à 55°C e estocados para serem analisados como compostas mensais para matéria seca, matéria orgânica, fibra em detergente neutro, nitrogênio, amido, ácidos graxos totais e minerais. As vacas foram pesadas e avaliadas para escore de condição corporal no dia de sua entrada no experimento e uma vez por semana no pré e pós parto.

Foram realizadas coletas de sangue nos dias 241, 257, 264, 286, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, relativos a prenhes durante o pré parto, e nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 42 relativos ao parto nos animais do pós parto. A coleta foi feita através de punção da veia coccígea em tubos a vácuo, não contendo anticoagulante para soro e contendo K₂EDTA para coleta de plasma, que foram processados e armazenados. As amostras de sangue coletadas no durante o pré parto foram usadas para análise de hormônios e metabólitos. As amostras coletadas no pós parto foram utilizadas para análise de NEFA, BHB, proteína total, glicose, insulina, IGF-1, leptina e colesterol.

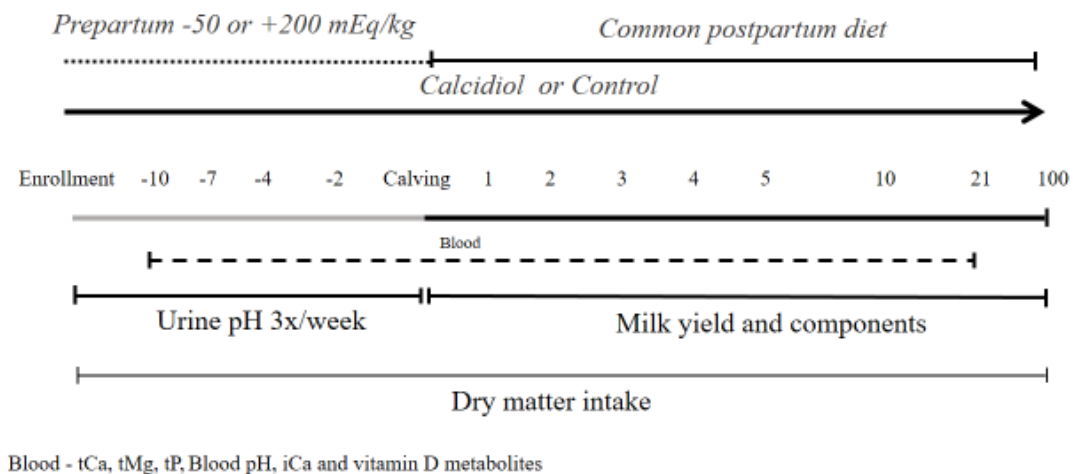
Amostras de plasma foram coletadas nos dias -6, -3, -1, 0, 1, 2, 3, 5, 7, e 14 relativo ao parto, e analisadas para concentração de vitamina D3, 25-hidroxivitamina D3, 25-hidroxivitamina D2, 3-epi-25-hidroxivitamina D3, 1, 25- dihidroxivitamina D3, e 24, 25-

dihidroxitamina D3. Amostras de sangue foram coletadas nos dias -9, -6, -3, -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 14, 21, 28 35, e 42 relativos ao parto para análise por absorção atômica da concentração de Ca e Mg total. Amostras de urina foram coletadas três vezes por semana no pré parto e aos 3 e 7 dias pós parto para avaliação do pH e determinação de creatinina, cálcio e fósforo total.

Foram feitas estimativas de balanço mineral de Ca e Mg, que foram calculadas na última semana de gestação e três primeiros dias de lactação baseado em mensurações do consumo de matéria seca, concentração de Ca e Mg na deita, perdas urinárias de Ca e Mg, perdas no colostro e leite de Ca e Mg. Todos os animais receberam na dieta pelo menos o mínimo requerido de vitamina D de acordo com o NRC (2001, 1,25 µg/kg de peso vivo ou 25,000 UI/dia).

As vacas foram ordenhadas dentro de 6 horas após o parto, a produção de colostro era mensurada e amostras em duplicada eram coletas para análise da concentração de gordura, proteína verdadeira, lactose, nitrogênio ureico e contagem de células somáticas (CCS). As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia, às 5 e 17 h, as produções de leite foram registradas automaticamente pelo software da ordenha. Amostras de leite de todas a vacas eram coletas uma vez por semana em duas ordenhas seguidas, para mensuração da concentração de gordura, proteína verdadeira, lactose, nitrogênio ureico e CCS.

Figura 1- Cronograma de coletas do experimento



Fonte: Ana Macedo (2020).

3.4 Resultados parciais do experimento

Quando o experimento ainda estava em fase inicial foram analisados os dados de pH de urina e concentração de 25(OH)D3 apenas para testar se os tratamentos estavam sendo efetivos, a dieta acidogênica foi efetiva em reduzir o pH, e a suplementação de CA foi efetiva em

aumentar a concentração de 25(OH)D3 no sangue. A concentração de Ca ionizável foi também de fato maior no pré e no pós parto para vacas da dieta acidogênica. Resultados do pós parto apresentaram interação entre fonte de vitamina D e DCAD da dieta, em que foram observados maiores valores de CMS para o grupo controle com DCAD positivo, e para o grupo suplementado com CA e DCAD negativo (Tabela 1). A produção de leite foi afetada com a suplementação de vitamina D, em que as vacas do grupo CA produziram menos leite do que as do grupo controle (31,5 vs. 33,5; $P = 0,03$). Essa mesma diferença foi encontrada para LCG (34,3 vs. 36,8 $P = 0,01$) e LCE (33,1 vs. 35,5 $P = 0,02$). A produção de gordura e proteína também foi afetada pela suplementação de vitamina D, as vacas suplementadas com CA produziram menos gordura (1,27 vs. 1,38 $P = 0,009$) e tenderam a produzir menos proteína (0,92 vs. 0,96 $P = 0,09$) do que as vacas não suplementadas. Houve interação DCAD e vitamina D (VALOR DE P) para a eficiência alimentar, sendo que o grupo controle com DCAD negativo apresentou eficiência alimentar superior aos demais grupos. De maneira geral, o DCAD não afetou a produção e composição do leite (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito do DCAD e fonte de vitamina D sobre produção e composição do leite.

Item	Treatment				SEM	P-value		
	Control 200	Calcidiol 200	Control -50	Calcidiol -50		DCAD	Vit D	DCAD x Vit D
DM intake, kg/d	18.9 ^a	17.4 ^b	17.4 ^b	18.5 ^a	0.4	0.57	0.63	0.001
Yield, kg/d								
Milk	34.0	31.3	33.0	31.7	0.9	0.77	0.03	0.42
3.5% FCM	37.9	34.3	35.8	34.3	1.0	0.31	0.01	0.30
ECM	36.4	33.0	34.5	33.3	0.9	0.36	0.02	0.26
Fat								
Yield, kg	1.43	1.28	1.33	1.27	0.04	0.15	0.009	0.25
True protein								
Yield, kg	0.99	0.91	0.94	0.94	0.02	0.66	0.09	0.12
Feed efficiency								
ECM/DMI	1.97 ^b	2.05 ^{ab}	2.16 ^a	1.90 ^b	0.06	0.75	0.15	0.01

Fonte: Ana Macedo (2020).

4 DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO

O estágio foi realizado na Universidade da Flórida nos Estados Unidos, teve duração de 15 de fevereiro até 15 de maio de 2020. O estágio foi realizado junto ao departamento de Animal Science, sob a orientação do Professor Doutor Corwin Nelson, que atua em pesquisas relacionadas aos efeitos de vitamina D sobre o desempenho e metabolismo de bovinos leiteiros.

As atividades desenvolvidas foram relacionadas ao experimento de pesquisa que teve como objetivo avaliar os efeitos do uso de dieta acidogênica pré parto e suplementação de calcidiol (CA) desde o nascimento, na produtividade e imunidade de vacas leiteiras nulíparas.

4.1 Descrição da fazenda

A Universidade conta com a fazenda experimental para condução das pesquisas chamada Dairy Unit. A fazenda possui rebanho de aproximadamente 600 vacas em lactação, que encontram-se divididas em 4 módulos de *free Stall* cama dupla composta de areia, sendo dois destes barracões convencionais para alojamento de vacas em experimento ou não, mas que não necessitam de mensuração de consumo de matéria seca. Os outros dois barracões destinados às pesquisas relacionadas à nutrição, que permitem por meio dos portões *calan gate* fazer a mensuração do consumo individual, estes barracões contam com troncos de manejo e balança que auxiliam na coleta de dados. A fazenda realiza duas ordenhas diárias em uma sala de ordenha linha baixa duplo 20, o horário das ordenhas era 5 h da manhã e 5 h da tarde.

Figura 2: *Free Stall* utilizado para alojamento das novilhas pré parto.

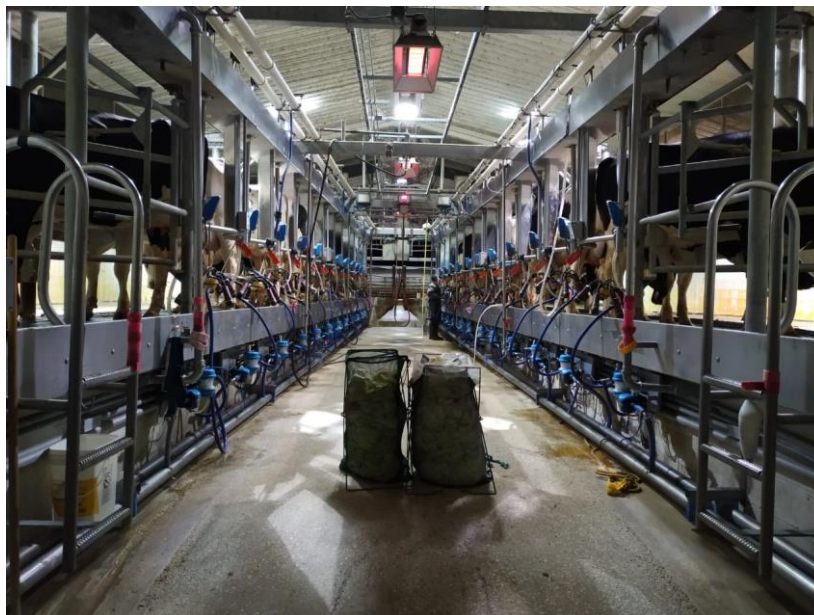


Fonte: Do autor (2020).

Para fornecer a alimentação de maneira precisa e prática a fazenda conta com carrinhos alimentadores do tipo *data ranger* que são utilizados também para fazer a pesagem das sobras da dieta. A fazenda conta também com galpão para armazenagem de alimentos concentrados

como polpa cítrica, caroço de algodão, farelo de soja, milho moído, minerais entre outros. As forragens utilizadas na fazenda são o feno de tifton e silagem de milho, armazenadas a seco e em silos trincheira, respectivamente.

Figura 3: Sala de ordenha



Fonte: Do autor (2020).

4.2 Descrição das atividades

As vacas foram alimentadas duas vezes ao dia, às 5 e às 11 h da manhã, sendo que antes da primeira alimentação fazia-se a mensuração das sobras e ajuste para 5 % de acordo com o oferecido no dia anterior. Diariamente antes da primeira alimentação eram feitas as coletas de fezes, urina, sangue, leite e sobras, além da avaliação da temperatura retal das vacas que estavam em dia de coleta relativamente a data do parto. Uma vez por semana foi realizada a coleta de amostras de leite de todas as vacas para análises de controle leiteiro. Semanalmente, amostras de todos os alimentos utilizados na dieta foram coletadas para avaliação da composição química.

Um dos grandes desafios da condução de experimentos com uso de portões *calan gate* é a adaptação dos animais, especialmente neste experimento que se tratava de nulíparas que não estavam acostumadas com esse tipo de rotina, desta forma uma das atividades mais recorrentes era o treinamento destes animais ao uso do portão. As nulíparas entravam no lote pré parto de 3 a 4 dias antes da data prevista para serem treinadas e apresentarem condições de consumo

normal e na quantidade esperada até o momento em que iniciasse a mensuração de consumo. Esse mesmo acompanhamento ocorria quando as nulíparas pariam e eram movidas para o lote pós parto, pois mesmo sabendo utilizar o portão muitas vezes apresentavam dificuldade de acesso devido a presença de outras vacas na linha de cocho.

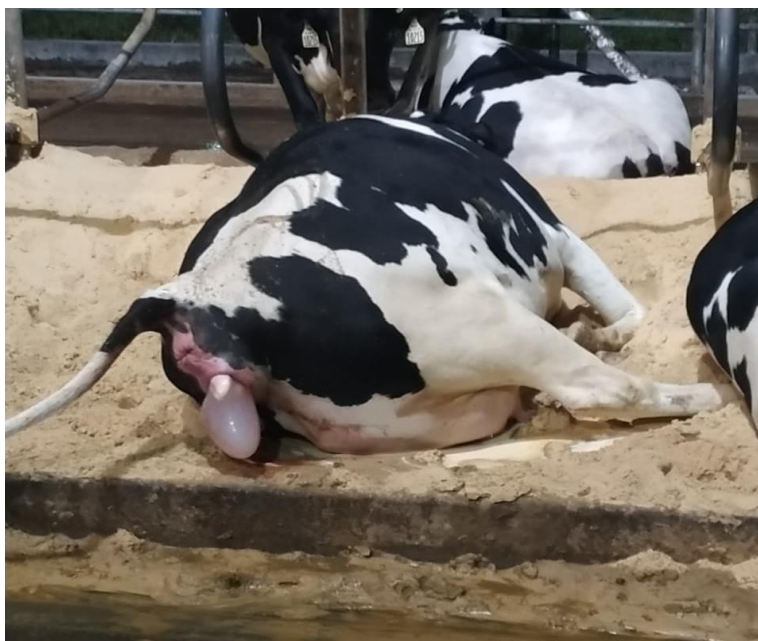
Figura 4: Novilhas pré parto sendo treinas a fazer uso do *Calan gate*



Fonte: Do autor (2020).

Outra atividade bastante recorrente era o acompanhamento do parto das vacas, o que exigia bastante atenção, pois como tratava-se apenas de novilhas a ocorrência de algum grau de distocia era bem comum. Logo após o parto eram feitas coletas de sangue da vaca e do bezerro, pesagem e condução do bezerro ao bezerreiro, encaminhamento da vaca para a ordenha, coleta de amostra do colostro e treinamento da vaca ao *calan gate* no lote pós parto.

Figura 5: Monitoramento do parto



Fonte: Do autor (2020).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O experimento realizado mostrou em dados parciais que a suplementação de CA reduziu a produção de leite total, LCG e LCE, e a produção de gordura total e proteína total. O grupo DCAD positivo e que não foi suplementado com CA no pré parto teve maior CMS e maior eficiência alimentar. Os resultados sugerem que a suplementação de CA para nulíparas pode não ser uma boa opção do ponto de vista econômico, tendo em vista que a utilização desse produto reduziu a produção de leite. O DCAD não teve efeito sobre produção composição do leite e eficiência alimentar, o que pode ser um indicativo de que a utilização de dietas com DCAD negativo para nulíparas pode não ser eficiente.

O estágio teve grande importância no sentido de aprimorar conhecimentos sobre pesquisas em nutrição de vacas leiteiras, ter contato com outros idiomas e permitiu adquirir uma visão melhor do perfil e de como funcionam as fazendas de leite nos Estados Unidos.

6 REFERÊNCIAS

ADAMS J. S.: HEWISON M. Update in vitamin D. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v. 1, n. 2, p. 471–478, 2010.

BLOCK E. Manipulating dietary anions and cations for prepartum aidry cows to reduce Incidence of milk fever. *Journal of dairy science*, v. 67, n. 12, p. 2939-2948, 1984.

CHARBONNEAU E. et al. Impact of lowering dietary cation-anion difference in nonlactating dairy cows: A meta-analysis. *Journal of dairy science*, v. 89, n. 2, p. 537–548, 2006.

DELUCA, H. F. Vitamin D: a new look at an old vitamin. *Nutrition Reviews*, v. 29, n. 8, p. 179-181, 2009.

DRACKLEY J. K. Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier?. *Journal of dairy science*. v. 82, n. 11, p. 2259-2253, 1999.

GOFF J. P. et al. Addition of chloride to a prepartal diet high in cations increases 1,25(OH)₂D response to hypocalcemia preventing milk fever. *Journal of dairy science*. v. 74, n. 11, p. 3863-3871, 1991.

GOFF J. P.: HORST R. L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of dairy science*, v. 80, n. 7, p. 1260–1268, 1997.

GOFF J. P. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *The veterinary journal*, v. 176, n. 1, p. 50-57, 2008.

GOFF J. P. et al. Diet-induced pseudohypoparathyroidism: A hypocalcemia and milk fever risk factor. *Journal of dairy science*, v. 97, n. 3, p. 1520–1528, 2014.

HORST R. L. et al. Symposium: calcium and vitamin calcium metabolism and utilization and metabolism in the dairy cow. *Journal of dairy science*, v. 77, p. 1936-1951, 1994.

HORST R. L. et al. Adapting to the transition between gestation and lactation: Differences between rat, human and dairy cow. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, v. 10, n. 2, p. 141-156, 2005.

LAPORTA J. et al. Peripheral serotonin regulates maternal calcium trafficking in mammary epithelial cells during lactation in mice. *Plos one*, v. 10, n. 20, p. 20-35, 2014.

LEAN I. J. et al. Hypocalcemia in dairy cows: meta-analysis and dietary cation anion difference theory revisited. *Journal of dairy science*, v. 89, n. 2, p. 669–684, 2006.

MARTINEZ N. et al. Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *Journal of dairy science*, v. 85, n. 12, p. 7158–7172, 2012.

MARTINEZ N. et al. Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows. *Journal of dairy science*, v. 97, n. 2, p. 874–887, 2014.

MARTINEZ N. et al. Effects of oral calcium supplementation on mineral and acid-base status, energy metabolites, and health of postpartum dairy cows. *Journal of dairy science*, v. 99, n. 10, p. 8397–8416, 2016.

MARTINEZ N. et al. Effects of prepartum dietary cation-anion difference and source of vitamin D in dairy cows: Health and reproductive responses. *Journal of dairy science*, v. 101, n. 3, p. 2563–2578, 2018.

NELSON C. D. et al. Vitamin D signaling in the bovine immune system: a model for understanding human vitamin d requirements. *Nutrients*, v. 4, n. 3, p. 181-196, 2012.

NELSON C. D. et al. Vitamin D status of dairy cattle: Outcomes of current practices in the dairy industry. *Journal of dairy science*, v. 99, n. 12, p. 10150–10160, 2016.

NRC. Nutrient requeriment of dairy cattle, 1989.

NRC. Nutrient requeriment of dairy cattle, 2001.

REINHARDT T. A. et al. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *The veterinary joruna*, v. 188, n. 1, p. 122-124, 2011.

RODNEY R. M. et al. Effects of prepartum dietary cation-anion difference and source of vitamin D in dairy cows: Vitamin D, mineral, and bone metabolism. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 3, p. 2519–2543, 2018.

SANTOS J. E. P. et al. Meta-analysis of the effects of prepartum dietary cation-anion difference on performance and health of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 102. n. 3, p. 1–21, 2019.

VIERA-NETO et al. Use of calcitriol to maintain postpartum blood calcium and improve immune function in dairy cows. *Journal of dairy science*, v. 100, n. 7, p. 5805–5823, 2017.

ZIMPEL R. et al. Effect of dietary cation-anion difference on acid-base status and dry matter intake in dry pregnant cows. *Journal of dairy science*, v. 101, n. 9, p. 8461–8475, 2018.

WILKENS, R. M. et al. Symposium review: Transition cow calcium homeostasis—Health effects of hypocalcemia and strategies for prevention. *Journal of Dairy Science*, v. 102, n. 3, p. 2009-2927, 2020.