

Artículo de Revisión

La vitamina D en la salud y en las patologías del bovino: un enfoque no clásico

Vitamin D in bovine health and pathologies: a non-classical approach

Georgina Tiraboschi¹, Carina Porporatto^{1,2}, Luciana Paola Bohl^{1,2*}

RESUMEN

La vitamina D es una vitamina liposoluble de relevancia para el ganado lechero, que no solo interviene en la homeostasis del calcio y el metabolismo óseo, sino que además ha sido asociada a la modulación del sistema inmunológico y a la menor incidencia de ciertas patologías del bovino. Las últimas acciones del secoesteroide, referidas como no clásicas, son de más reciente descubrimiento y continúan en estudio. El objetivo de esta revisión bibliográfica fue presentar y analizar los roles de la vitamina D y sus metabolitos en la salud y en las patologías del bovino. Se incluyó una sección sobre los efectos inmunomoduladores y antibacterianos en la glándula mamaria bovina, donde se conoce que la vitamina y sus precursores disminuyen la invasión bacteriana y regulan la expresión de componentes de la respuesta inmunitaria innata. A los fines de contextualizar, también se describe el metabolismo de la vitamina D, la fuente y cuantificación de sus metabolitos en leche y plasma de bovinos, su papel en la nutrición y en la prevención de enfermedades, así como la toxicidad. En conclusión, el estudio de los efectos no clásicos de estos esteroides aporta evidencias que pueden ser utilizadas para diseñar terapias con compuestos naturales para ser aplicadas en animales productores de alimentos.

Palabras clave: vitamina D, bovinos, patologías, inmunomodulador, antimicrobiano

¹ Instituto Multidisciplinario de Investigaciones y Transferencia Agroalimentaria y Biotecnológica (IMITAB), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional Villa María (UNVM), Córdoba, Argentina

² Instituto Académico Pedagógico de Ciencias Básicas y Aplicadas (IAPCByA), Universidad Nacional Villa María (UNVM), Córdoba, Argentina

* Email: lbohl@unvm.edu.ar

Recibido: 19 de agosto de 2022

Aceptado para publicación: 12 de mayo de 2023

Publicado: 29 de junio de 2023

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ABSTRACT

Vitamin D is a fat-soluble vitamin of relevance for dairy cattle, which is not only involved in calcium homeostasis and bone metabolism but has also been associated with the modulation of the immune system and a lower incidence of certain bovine pathologies. The latest actions of the secosteroid, referred to as non-classical, are of more recent discovery and are still under study. The objective of this bibliographic review was to present and analyse the roles of vitamin D and its metabolites in bovine health and pathologies. A section on immunomodulatory and antibacterial effects in the bovine mammary gland was included, where the vitamin and its precursors are known to decrease bacterial invasion and regulate the expression of components of the innate immune response. For purposes of contextualization, the metabolism of vitamin D, the source and quantification of its metabolites in bovine milk and plasma, its role in nutrition and disease prevention, as well as toxicity are also described. In conclusion, the study of the non-classical effects of these steroids provides evidence that can be used to design therapies with natural compounds to be applied in food-producing animals.

Key words: vitamin D, cattle, pathologies, immunomodulator, antimicrobial

INTRODUCCIÓN

La vitamina D y sus metabolitos cumplen funciones múltiples en humanos y en otras especies animales, algunas muy conocidas y otras que actualmente están en estudio (Bikle, 2009; Nelson *et al.*, 2012; Hodnik, 2020; Eder y Grundmann, 2022; Ismailova y White, 2022; Holick, 2023). El propósito de esta revisión bibliográfica es exponer y analizar los antecedentes acerca de los roles de la vitamina D en los bovinos. A los fines de contextualizar el estudio se presenta la química de la vitamina D, los niveles normales de los metabolitos en plasma y leche de bovinos y las fuentes de obtención. Seguidamente se presentan las evidencias experimentales que la asocian con algunas patologías del ganado bovino, con énfasis en las acciones inmunomoduladoras y antibacterianas en la glándula mamaria. Los conocimientos de las acciones de compuestos naturales como la vitamina D en los bovinos podrían ser utilizados para diseñar tratamientos alternativos como también complementarios a los antibióticos para aplicar en animales de producción para contrarrestar la diseminación de

resistencia a antimicrobianos por los patógenos y la presencia de residuos de antibióticos en carne y leche (Oliver y Murinda, 2012; Kurjogi *et al.*, 2019; Qamar *et al.*, 2023).

Metabolitos y Metabolismo de la Vitamina D

Hay dos vitámeros de la vitamina D, la D₂ o ergocalciferol, proveniente de las plantas y la D₃ o colecalciferol, sintetizada por el organismo o absorbida de una fuente de origen animal (Blanco A y Blanco G, 2016). Estas son biológicamente inactivas y requieren de dos hidroxilaciones para convertirse en la hormona activa, la 1,25-dihidroxitamina D (Jones *et al.*, 2014). La 25-hidroxitamina D₃ o 25-hidroxicolecalciferol (25(OH)D₃) incluye a la vitamina D sintetizada por el organismo, la absorbida de una fuente de origen animal o la proveniente de un suplemento de colecalciferol (Ferrari *et al.*, 2017). A diferencia de la vitamina D₃, la D₂ se incorpora con los alimentos (origen vegetal/fúngico) y con suplementos vitamínicos (Jäpelt *et al.*, 2011; Ferrari *et al.*, 2017).

Los efectos de los metabolitos de la vitamina D_2 (vitamina D_2 , $25(OH)D_2$, $1,25(OH)_2D_2$) no han sido ampliamente descritos a excepción de la regulación del balance de calcio. Horst y Reinhardt (1983) indicaron que los rumiantes distinguen entre las vitaminas D_2 y la D_3 administradas por vía oral, debido posiblemente a que los microorganismos del rumen prefieren y degradan la vitamina D_2 o porque la absorción intestinal de D_2 es menos eficiente. En este sentido, Yue *et al.* (2017) postularon que, dado que la vitamina D_2 es una fuente de vitamina D en las vacas lecheras, se requiere investigar los efectos no clásicos de los metabolitos de la vitamina D_2 .

La síntesis endógena de vitamina D_3 se produce en una reacción no enzimática, cuando el 7-dehidrocolesterol, precursor directo del colesterol, se expone a los rayos ultravioletas (UV) B. La actividad de la enzima 7-dehidrocolesterol reductasa (DHCR7) determina el nivel de su sustrato 7-dehidrocolesterol en las membranas eucariotas (Prabhu *et al.*, 2016). El 7-dehidrocolesterol absorbe la energía de la radiación UV-B a través del doble enlace entre el carbono (C) 7 y el C8, lo que crea una molécula termodinámicamente inestable, la pre-vitamina D_3 , caracterizada por un anillo B abierto entre el C9 y el C10 (Holick, 1981). Con la catálisis térmica, la pre-vitamina D_3 se isomeriza rápidamente en vitamina D_3 . La exposición continua a los rayos UV-B también convierte la pre-vitamina D_3 en lumisterol, taquisterol y otros fotoproductos de los cuales no se derivan compuestos con función endocrina (Holick *et al.*, 1981).

Después de la absorción intestinal y la síntesis en la piel, la vitamina D_3 se transporta al hígado, donde sufre la primera hidroxilación por parte de las enzimas 25-hidroxilasas (CYP2R1 y CYP27A1) que convierten la vitamina D_3 en $25(OH)D_3$ (25-hidroxivitamina D_3 o calcidiol). La segunda hidroxilación tiene lugar en los túbulos proximales de los riñones para dar una forma activa de vitamina D llamada $1,25(OH)_2D_3$

(1,25-dihidroxivitamina D_3 o calcitriol) (Makris *et al.*, 2020). La hidroxilación de la $25(OH)D_3$ también puede tener lugar en otros tejidos y células, incluidos los huesos, la placenta, los queratinocitos, los macrófagos, los linfocitos T, las células epiteliales del colon, las células de los islotes del páncreas, y las células epiteliales de la glándula mamaria bovina, entre otros (Bikle 2009; Téllez-Pérez *et al.*, 2012; Bouillon y Bikle, 2019). En estos sitios se expresa la enzima 1α -hidroxilasa (CYP27B1), que media la hidroxilación adicional en la posición C1 (Michigami, 2017). El calcitriol producido en tejidos extrarrenales actúa localmente (Michigami, 2017; Ismailova y White, 2022). La mayoría de los metabolitos de la vitamina D se unen a las proteínas de unión a la vitamina D (VDBP) o a las albúminas para viajar en el torrente sanguíneo (Herrmann *et al.*, 2017). Por su parte, en el ergocalciferol ocurren las mismas transformaciones aquí descritas (Blanco A y Blanco G, 2016).

La molécula de $1,25(OH)_2D_3$ resultante se une con gran afinidad al receptor nuclear de vitamina D (VDR), que es un factor de transcripción (Ramagopalan *et al.*, 2010). Las enzimas 25-hidroxilasas y 1α -hidroxilasa, así como el VDR son componentes esenciales de la endocrinología de la vitamina D (Michigami, 2017).

La CYP24A1, otra enzima del citocromo P450 con actividad 24-hidroxilasa, inactiva tanto la $25(OH)D_3$ como la $1,25(OH)_2D_3$ (Jones *et al.*, 2014; Makris *et al.*, 2020). Esta enzima es inducida por el calcitriol en los tejidos blanco, intestino y riñones, para proporcionar un control de las concentraciones de $1,25(OH)_2D_3$. Las células inmunitarias también tienen actividad CYP27B1 y CYP24A1 (Merriman *et al.*, 2018). En la Figura 1 se esquematiza la síntesis de la vitamina D y el proceso de degradación de sus metabolitos.

La síntesis de vitamina D está regulada en múltiples niveles. Por ejemplo, mediante síntesis de productos inactivos sin función

endocrina en la piel frente a una exposición excesiva a los rayos UV-B, a través de la regulación de la 1 α -hidroxilación en los riñones y también con la regulación de la expresión de CYP24A1 (Herrmann *et al.*, 2017). El colesteciferol y 25(OH)D₃ se almacenan principalmente en los tejidos adiposo y muscular y en otros sitios como hígado, corazón, pulmones y plasma (Mawer *et al.*, 1972). Por ejemplo, se ha descrito que el músculo esquelético es un sitio de almacenamiento activo para la vitamina D contribuyendo al man-

tenimiento de los niveles fisiológicos durante los periodos de baja exposición solar a los rayos UV-B (Girgis y Brennan-Speranza, 2021).

Niveles de Vitamina D

La disponibilidad o el estado de la vitamina D se puede determinar mediante la medición de la concentración de 25-hidroxivitamina D en suero o plasma, ya que este metabolito es el depósito más importan-

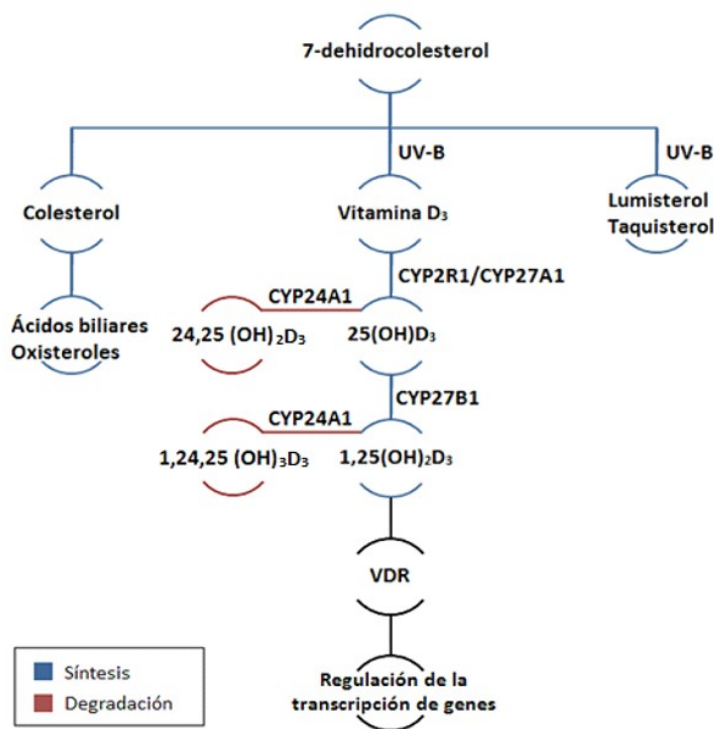


Figura 1. Vitamina D₃, metabolitos y metabolismo. La síntesis endógena de vitamina D₃ se produce cuando el precursor del colesterol, 7-dehidrocolesterol se expone a la radiación UV-B. Esta reacción no enzimática produce pre-vitamina D₃ (no mostrada) que se isomeriza rápidamente a vitamina D₃. Sin embargo, con la exposición continua a los rayos UV-B, la mayor parte de la pre-vitamina D₃ se convierte en lumisterol y taquisterol que no tienen función endocrina conocida. Los ácidos biliares y los oxisteroles son otros derivados importantes del colesterol con funciones endocrinas. Independientemente de la fuente de obtención, las enzimas hidroxilasas (CYP2R1 y CYP27A1) convierten la vitamina D₃ en 25(OH)D₃ en el hígado y la CYP27B1 produce 1,25(OH)₂D₃ en los riñones (u otros sitios). La 1,25(OH)₂D₃ es el ligando de alta afinidad al receptor de vitamina D (VDR) nuclear. CYP24A1 cataliza reacciones de hidroxilación que conducen a la degradación tanto de 25(OH)D₃ y 1,25(OH)₂D₃. Fuente: elaboración propia

te en el organismo, con una vida media de dos a tres semanas (Nelson *et al.*, 2016; Serrano Díaz *et al.*, 2017). Las técnicas inmunológicas se han utilizado tradicionalmente para medir la vitamina D y sus metabolitos (Hollis y Napoli, 1985; Kasalová *et al.*, 2015). Sin embargo, estas presentan varios problemas, siendo uno de los más relevantes la incapacidad de distinguir entre la 25(OH)D₂ y la 25(OH)D₃ debido a la reactividad cruzada de los anticuerpos (Kasalová *et al.*, 2015). Actualmente, los métodos de detección más utilizados se basan en la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas o con detección ultravioleta porque ofrecen ventajas como sensibilidad, flexibilidad y especificidad, además de la posibilidad de distinguir entre las formas 25-hidroxiladas del cole- y el ergocalciferol (Zerwekh 2008; Gomez *et al.*, 2015; Chin *et al.*, 2018). Normalmente se requiere un pretratamiento de la muestra antes de la determinación analítica de las vitaminas y se utilizan estándares internos y externos (Kasalová *et al.*, 2015). Las técnicas utilizadas para la determinación de la vitamina D en leche pueden ser inmunológicas (ensayo competitivo de unión a proteínas – CPBA–, inmunoensayo enzimático – EIA–, radioinmunoensayo – RIA–) (Kasalová *et al.*, 2015) o no inmunológicas (cromatografía líquida de alto rendimiento – HPLC–, cromatografía líquida-espectrometría de masas – LC-MS–) (Gómez *et al.*, 2015; Kasalová *et al.*, 2015).

La información sobre la fuente principal de vitamina D en el ganado difiere según la bibliografía consultada. Webster (2020) indica que proviene de la provitamina ergosterol de las plantas verdes, que se convierte en ergocalciferol o vitamina D₂ por la luz UV. A esto se suma la síntesis de vitamina D a partir de provitaminas en el ganado que está al aire libre durante la luz del día. En contraste, Hymøller y Jensen (2010) postulan que la piel es la fuente principal de esta vitamina en el ganado en pastoreo. En relación a la síntesis cutánea, se ha reportado que los terneros con pelaje de colores más oscuros presentan concentraciones séricas de 25(OH)D total y

25(OH)D₃ más bajas que los terneros con pelaje mixtos (Callaby *et al.*, 2020).

Las necesidades de vitamina D del ganado son usualmente escasas porque su dieta es rica en calcio (Webster, 2020). Sin embargo, en los sistemas productivos donde el ganado se encuentra estabulado bajo techo y sin acceso a la luz solar, se requiere un suplemento de vitamina D, generalmente en forma de vitamina D₃ (Hidiroglou y Karpinski, 1989; Nelson *et al.*, 2016). Por otro lado, el inicio de la lactancia altera drásticamente el metabolismo del calcio (Klein, 2014). Para ello, la aplicación inyectable de vitamina D o su inclusión en suplementos con alto contenido en fósforo antes del parto puede reducir el riesgo de la hipocalcemia puerperal (Webster, 2020).

La vitamina D actúa de forma endocrina para la homeostasis del calcio, pero también lo hace de forma intracrina y paracrina para las funciones no calcémicas (Hewison, 2010). Es así que es posible que los requisitos de vitamina D para la homeostasis del calcio y la función inmunitaria difieran y los suplementos dietarios o inyectables solo mantengan el equilibrio de calcio y sean insuficientes para la función inmunológica y/u otras (Nelson *et al.*, 2012). Ante esto, se requiere determinar las concentraciones óptimas de vitamina D₃ necesarias para la función inmunológica y estudiar el efecto de las variables asociadas a la síntesis de la vitamina D₃ en la piel, como la exposición a la luz UV, los niveles de 7-deshidrocolesterol y la pigmentación (Zempleni *et al.*, 2007), sobre la inmunidad y la salud del ganado.

La concentración fisiológica de 25(OH)D en plasma bovino es de 36.9 ± 7.1 ng/ml (McDermott *et al.*, 1985). Sin embargo, Nelson *et al.* (2016) indicaron que puede llegar a 80 ng/ml en animales bajo una suplementación fuerte. A pesar de las variaciones, se ha establecido que concentraciones circulantes de 25(OH)D superiores a 20 ng/ml son adecuadas para la homeostasis del calcio (NRC, 2001). Respecto a los otros

metabolitos, la concentración de vitamina D en plasma bovino es de 1.72 ± 0.67 ng/ml (Horst y Littledike, 1982) y la de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ varía entre 5 a 20 pg/ml dependiendo de la preñez y la lactancia (Horst *et al.*, 1994).

Holcombe *et al.* (2018) analizaron las concentraciones de vitamina D en el suero del ganado lechero sin encontrar asociación entre las concentraciones de $25(\text{OH})\text{D}$ y la estación del año, la edad del animal y la paridad, pero encontraron una depleción significativa del metabolito en vacas en fase posparto en comparación a las que estaban en preparto tardío. Los autores lo atribuyeron al consumo de $25(\text{OH})\text{D}$ para el funcionamiento del sistema inmunitario y la homeostasis de calcio en la lactancia temprana, momento en el cual incrementa la susceptibilidad a las enfermedades.

Yue *et al.* (2018) demostraron que la reposición a niveles fisiológicamente normales de 25-hidroxivitamina D en el plasma de vacas lecheras sanas que habían sufrido una depleción de vitamina D no afectaron los parámetros inmunológicos como leucocitos en sangre periférica, células somáticas en leche e inmunoglobulinas en plasma y leche, lo cual se opone al cúmulo de evidencia que existe sobre los roles de la vitamina D en el sistema inmunitario bovino (Nelson *et al.*, 2012; Merriman *et al.*, 2017, 2018; Eder y Grundmann, 2022). Respecto a la leche bovina, Weir *et al.* (2017) mencionaron que el estado de vitamina D de la vaca afecta el contenido de vitamina D de la leche, de allí que ciertos cambios en las prácticas ganaderas (ausencia de luz solar) o de las fuentes dietéticas de vitamina D pueden afectar el contenido de vitamina D de la leche producida.

La concentración de vitamina D en la leche es baja, requiriéndose de un método de separación selectivo y un método de detección altamente sensible (Kasalová *et al.*, 2015). Algunos trabajos reportan concentraciones de vitamina D sin diferenciar entre las vitaminas D_2 y D_3 , ni dan información sobre la inclusión o exclusión de los metabolitos de

la vitamina D o sobre cómo se obtuvieron los datos (Schmid y Walther, 2013). Los métodos analíticos modernos (HPLC, LC-MS, LC-MS/MS – cromatografía líquida masa/masa) abrieron la posibilidad de diferenciar entre los metabolitos (Kasalová *et al.*, 2015). En el Cuadro 1 se muestran las concentraciones de los metabolitos más importantes de la vitamina D_3 en plasma y leche bovina.

Suplementación

La finalidad de la suplementación en el ganado lechero es proporcionar vitamina D_3 para alcanzar una concentración sérica suficiente de 25-hidroxicolecalciferol para realizar procesos metabólicos múltiples. El empleo de sistemas de producción bajo confinamiento y la alimentación con piensos y subproductos ha aumentado la necesidad de suplementar la dieta de las vacas lecheras con vitamina D (Webster, 2020). Las concentraciones de 25-hidroxivitamina D en plasma de entre 20 y 50 ng/ml se consideran normales, y se ha establecido que niveles por debajo de 5 ng/ml son indicativos de deficiencia de vitamina D, en tanto que concentraciones de 200 a 300 ng/ml indicarían toxicidad (Nelson *et al.*, 2016).

Tanto la vitamina D_2 como la vitamina D_3 se utilizan para suplementar las dietas. Sin embargo, se debe considerar que parte de la vitamina D de la dieta es degradada por las bacterias del rumen a metabolitos inactivos (Sommerfeldt *et al.*, 1983; Gardner *et al.*, 1988). Este inconveniente se puede evitar con el uso de inyectables, aunque la dosis máxima tolerable de vitamina D administrada por vía parenteral es al menos 100 veces menor que la dosis máxima tolerable por vía oral y las inyecciones repetidas pueden ser tóxicas (NRC, 2001). El colecalciferol se puede mezclar con el alimento del ganado en forma de polvo, añadir a los sustitutos de la leche para terneros (Commission Implementing Regulation, 2017) o administrarse por vía IM y SC en bovinos, ovinos, equinos, porcinos, conejos y pollos (EMEA/MRL, 1998).

Cuadro 1. Niveles de metabolitos de la vitamina D en plasma y leche de ganado bovino

	Vitamina D ₃ (Colecalciferol)	25(OH)D ₃ (Calcidiol)	1,25(OH) ₂ D ₃ (Calcitriol)
Plasma	1.72 ± 0.67 ng/ml (Horst y Littledike, 1982) ^A	36.9 ± 7.1 ng/ml (Horst y Littledike, 1982) ^{A,B}	5-20 pg/ml (Horst <i>et al.</i> , 1994) ^C
Leche	0.02-1.38 µg/l (Schmid y Walther, 2013)	0.042-0.5 µg/l (Schmid y Walther, 2013)	5.4 ± 1.2 pg/ml (Hollis <i>et al.</i> , 1981) ^D

^A En vacas adultas (47-72 meses de edad) hembras no preñadas, fuera de lactancia y alojadas en corrales exteriores, suplementadas con vitamina D₃ según las recomendaciones del NRC

^B Nelson *et al.* (2016) reportaron un rango de 25(OH)D₃ entre 50-80 ng/mL en vacas suplementadas con vitamina D₃, evaluando las variaciones de 25(OH)D₃ en función etapas de lactancia, edad, sistemas de alojamiento y ubicación dentro de Estados Unidos

^C En vacas adultas no preñadas y fuera de lactancia. Al final de la preñez puede aumentar hasta 20-50 pg/ml. Durante el parto y el inicio de la lactancia se elevó a valores del 100 a >300 pg/ml

^D En vacas suplementadas con 4000 UI/d de colecalciferol. En animales suplementadas con 40 000 UI/día de colecalciferol la concentración de 1,25(OH)D₃ fue de 4.2 ± 0.5 pg/mL

Hibbs y Conrad (1983) concluyeron que vacas suplementadas con 50 a 70 UI de vitamina D/kg de peso corporal presentaban una mayor producción de leche, así como un mayor apetito en comparación con vacas sin suplemento de vitamina D o suplementadas con 120-140 o más UI/kg; esto último, posiblemente debido al comienzo de intoxicación por vitamina D. El NRC (2001) recomienda suplementar a vacas lecheras adultas con 70 UI/kg de vitamina D para obtener beneficios reproductivos, de salud y de producción láctea. Por otro lado, la suplementación con 25(OH)D₃ tiene un margen de seguridad amplio, superior a 400 ng/ml en plasma (Celi *et al.*, 2018; Tomkins *et al.*, 2020).

La toxicidad por vitamina D se puede dar por una suplementación excesiva o como consecuencia de la ingestión de plantas calcinogénicas (con glucósidos de 1,25(OH)₂D₃ o incluso una forma activa de la vitamina). Las plantas calcinogénicas más importantes y de presencia en territorio argentino son *Solanum malacoxylon* y *Nierembergia veitchii*. Los síntomas clínicos de la calcinosis (depósitos de calcio en tejidos extraesqueléticos) son emaciación, reducción de la ingesta de alimento, trastornos de la locomoción, aumento

del pulso y de la frecuencia respiratoria, y reducción de la producción de leche, entre otros (Wasserman, 1975; Machado *et al.*, 2020). En el examen post-mortem se observa extensa calcificación del endocardio, grandes vasos, pulmones, bronquiolos, riñones, abomaso, tendones y ligamentos (Littledike y Horst, 1980; Mello, 2003). Sin embargo, la hipercalcemia puede responder a múltiples causas como neoplasias, hiperparatiroidismo, micosis, osteoporosis, hipoadrenocorticismos, y nefropatía crónica, entre otras (Klein, 2014; Machado *et al.*, 2020). Las elevaciones leves pero persistentes del calcio sérico (12 a 14 mg/dl) pueden causar cálculos renales, sangre en la orina y una micción dolorosa y frecuente, mientras que la hipercalcemia intensa (>14 mg/dl) puede progresar hacia insuficiencia renal aguda debido a la mineralización del tejido renal (Klein, 2014).

Funciones Clásicas de la Vitamina D

La investigación sobre las funciones de la vitamina D en el ganado bovino ha estado orientada principalmente a comprender las funciones endocrinas en la regulación de la homeostasis del calcio, especialmente en lo

que respecta a las intensas demandas de calcio al inicio de la lactancia (Nelson *et al.*, 2012).

Los efectos más importantes de la vitamina D consisten en aumentar la absorción de calcio en el tracto gastrointestinal y estimular la síntesis de proteínas en las células de la mucosa que influyen sobre el movimiento de calcio (Klein, 2014). Asimismo, tiene efectos sobre el movimiento de los iones de calcio hacia el líquido extracelular y la resorción ósea, además de potenciar los efectos de la PTH en el metabolismo óseo del calcio. Otros órganos blancos de la vitamina D son los riñones, donde regula la absorción del calcio y el fósforo coordinadamente con otras hormonas y factores (Klein, 2014).

Hay una relación entre el sistema óseo, fuertemente influenciado por la vitamina D, y el metabolismo energético de las vacas, pudiendo interactuar con otros tejidos como el pancreático y el adiposo. Esta relación se lleva a cabo a través de la osteocalcina (OC), proteína no colágena producida por los osteoblastos durante la formación ósea. En circulación se encuentran tanto la OC totalmente carboxilada (cOC), biológicamente inactiva, como la descarboxilada (uOC) que es la forma activa (Mizokami *et al.*, 2017). Durante la reabsorción ósea aumenta la porción uOC por acción de los osteoclastos, la cual regula los niveles de insulina en circulación. La insulina inhibe la formación de hueso y promueve su reabsorción y, por lo tanto, aumenta la liberación de uOC. También estimula la secreción de adiponectina por los adipocitos. Esta última aumenta el depósito óseo y la captación de glucosa. Las células adiposas también actúan sobre el metabolismo óseo a través de la leptina (hormona de la saciedad), que inhibe indirectamente la actividad de los osteoblastos y, por consiguiente, la producción de OC (Lean *et al.*, 2014).

Funciones No Clásicas de la Vitamina D

La vitamina D ha sido asociada a la prevención de enfermedades y el bienestar del ganado lechero, indicando su importancia en

el desarrollo del raquitismo, la osteomalacia, la hipocalcemia y enfermedades asociadas como, por ejemplo, la mastitis, metritis, desplazamiento del abomaso, cetosis, retención de placenta y prolapso uterino (Hodnik *et al.*, 2020). Dado que las vacas lecheras son propensas a diversas enfermedades infecciosas durante el periodo periparto, el funcionamiento óptimo del sistema inmunitario es crucial durante esta fase. Por ello los conocimientos acerca de la modulación del sistema inmunitario del bovino por la vitamina se exponen en la siguiente sección haciendo foco en la mastitis. Posteriormente, se resumen las evidencias que asocian la vitamina D con algunas patologías del bovino extraídas de estudios científicos, revisiones bibliográficas y libros de texto publicados en los últimos años. Se utilizó como criterio de inclusión que exista más de un trabajo sobre la temática.

Efectos Inmunomoduladores y Antimicrobianos de la Vitamina D en la Glándula Mamaria

Las células del sistema inmunitario pueden convertir la $25(\text{OH})\text{D}_3$ en $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de manera no regulada, y esta modula el sistema inmunitario innato y adaptativo de manera autocrina y paracrina. Se reconoce que la vitamina D influye en respuestas inmunitarias innatas y adaptativas en el ganado, al igual que en los seres humanos (Nelson *et al.*, 2012). Sin embargo, el sistema inmunitario innato bovino presenta algunas diferencias respecto a los efectos de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en comparación al de los humanos (Nelson *et al.*, 2012).

La glándula mamaria bovina cuenta con un amplio sistema de defensas contra los patógenos, que incluye desde las barreras físicas y la respuesta inespecífica temprana hasta las defensas celulares y humorales específicas (Riollet *et al.*, 2000; Rainard, 2003; Sordillo, 2018). Aun así, algunos patógenos logran pasar ese sistema de defensa y producir patologías mamarias. La mastitis produce pérdidas económicas importantes debido al tratamiento, pérdidas en la producción,

descarte temprano de animales y cambios en la calidad de la leche, entre otros (Halasa *et al.*, 2007; Vanderhaeghen *et al.*, 2015). La causa principal de mastitis es la infección intramamaria producida por bacterias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus coagulans* negativo (SCN) (Keane, 2019; Rossi *et al.*, 2019). La resistencia innata y el estado inmunitario del huésped son factores importantes que influyen sobre la gravedad y la resolución de la infección intramamaria, donde la respuesta inmune del huésped varía dependiendo de la especie y cepa de la bacteria actuante (Keane, 2019).

La efectividad de curación en casos crónicos después del tratamiento con antibióticos es baja y no existe una terapia efectiva para eliminar completamente la infección del cuarto mamario afectado (Barkema *et al.*, 2006). *Staphylococcus aureus* tiene la particularidad de invadir y sobrevivir dentro de los fagocitos, incluidos los neutrófilos y los macrófagos (Gresham *et al.*, 2000; Voyich *et al.*, 2005). Este patógeno también puede establecerse en colonias (Atalla *et al.*, 2011) y promover la formación de biofilm (Oliveira *et al.*, 2006; Felipe *et al.*, 2017) sin causar manifestaciones clínicas, lo cual se asocia con el fracaso del tratamiento con antibióticos (Keefe, 2012). Asimismo, se ha demostrado que el crecimiento en biofilm se encuentra asociado con evasión de la respuesta inmunitaria del huésped (Bohl *et al.*, 2021), de allí que resulta relevante el diseño de terapias más eficientes que permitan modular la compleja interacción huésped-biopelícula en la glándula mamaria bovina.

Existen algunas evidencias sobre el rol de los metabolitos de la vitamina D en el contexto de la mastitis bovina. Bandzaite *et al.* (2005) encontraron niveles séricos más bajos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en novillas con cría y en vacas con mastitis, lo cual lleva a reflexionar sobre si ello puede predisponer a la mastitis o es una consecuencia de ella. Téllez-Pérez *et al.* (2012) encontraron que el colecalciferol

redujo la internalización de *S. aureus* y reguló diferencialmente la expresión de péptidos antimicrobianos (PA) en células epiteliales mamarias bovinas (bMEC). Al respecto, Yue *et al.* (2017) reportaron que el pretratamiento de la línea de células epiteliales mamarias bovinas MAC-T con $25(\text{OH})\text{D}_2$ redujo la adhesión de *S. aureus*, mientras que el pretratamiento con $25(\text{OH})\text{D}_3$ inhibió la invasión de *S. aureus*. Por otro lado, resultados preliminares indican que el tratamiento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimula la fagocitosis de especies de del género *Staphylococcus* formadoras de biofilm aisladas de animales con mastitis por macrófagos bovinos (BoMac) (Tiraboschi *et al.*, 2022).

En relación al mecanismo de acción de la vitamina D se publicó que el colecalciferol y *S. aureus* inhibieron la expresión del ARN mensajero (ARNm) del receptor tipo Toll 2 (TLR2) en células bMEC, y el colecalciferol moduló la abundancia de TLR2 de la membrana diferencialmente (sin cambio con colecalciferol 50 nM y aumentada con 200 nM); asimismo, el colecalciferol disminuyó la expresión del ARNm del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleucina (IL)- 1β y aumentó la de la quimiocina ligando 5 (CCL5) o RANTES y la de IL-10, lo que sería un indicativo que el colecalciferol podría ser un modulador de la inmunidad innata eficaz en los tejidos de la glándula mamaria (Alva-Murillo *et al.*, 2014). Asimismo, Frutis-Murillo *et al.* (2019) encontraron que el colecalciferol reguló la expresión de los genes de adherencia, así como los de internalización de las bacterias en las células fagocitarias no profesionales, lo que podría conducir al desarrollo de agentes para el control de los patógenos. Por otro lado, Wen *et al.* (2020) sugieren que el efecto antiinflamatorio del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ puede ser mediado por la atenuación del estrés del retículo endoplasmático y la respuesta inflamatoria inducida por el factor nuclear (NF)- κB en las células MCF-7 (línea de células epiteliales mamarias humanas transformadas).

En un estudio *in vivo* se observó que el calcitriol aumentó la expresión de los genes del óxido nítrico sintasa (iNOS) y las β -defensinas (DEFB4 y DEFB7), sumando evidencias del rol de la vitamina D en las funciones inmunológicas innatas del ganado bovino (Merriman *et al.*, 2017). Además, el tratamiento intramamario con 25(OH) D_3 disminuyó el recuento de bacterias e indicadores de la gravedad de la mastitis (disminución de la temperatura rectal, del número de células somáticas y de los niveles de albúmina sérica bovina en leche y un aumento de la ingesta) en las vacas infectadas experimentalmente con *S. uberis* y retardó la pérdida de la producción de leche inducida por la infección (Lippolis *et al.*, 2011; Merriman *et al.*, 2018)

Nelson *et al.* (2010) encontraron la expresión de 1 α -hidroxilasa y 24-hidroxilasa aumentada en macrófagos bovinos en respuesta a la infección bacteriana con *S. uberis in vivo*, concluyendo que esta enzima proporciona 1,25(OH) $_2D_3$ para la regulación de genes sensibles a la vitamina D en el lugar de la infección. También observaron que la expresión de VDR en las células aisladas de la leche de la glándula mamaria infectada fue mayor que en las células de la glándula mamaria contralateral no infectada y en los leucocitos de la sangre periférica.

Los antecedentes detallados en esta sección dan cuenta del potencial que tiene la vitamina D y sus metabolitos en el contexto de las infecciones intramamarias producidas por bacterias en bovinos. Los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* e *in vivo*; utilizando diferentes diseños experimentales, metabolitos de la vitamina D y vías de administración; indican que esta podría modular la inmunidad en la glándula mamaria del bovino. Los resultados publicados alientan a ampliar estos estudios con la finalidad de corroborar y utilizar el conocimiento en el diseño de terapias para la mastitis bovina nuevas y mejores.

Evidencias que Asocian la Vitamina D con Patologías No Mamarias

Se ha establecido que la vitamina D puede prevenir el raquitismo, osteomalacia e hipocalcemia (Lean *et al.*, 2014). El raquitismo se presenta en los terneros caracterizándose por una osificación endocondral anormal y una formación ósea defectuosa, en tanto que la osteomalacia ocurre en el ganado vacuno adulto alterando al hueso durante la remodelación (Maxie, 2016). Ambas enfermedades causan deformidades de las extremidades, fracturas, y agrandamiento de las placas de crecimiento debido a la expansión del cartílago hipertrófico, entre otras (Thompson y Cook, 1987; Dittmer y Thompson, 2011). Las deficiencias dietéticas de vitamina D o fósforo son las causas más comunes de estos procesos, no así la disminución en la concentración extracelular de calcio, ya que esta se corrige rápidamente por la acción de la PTH y la vitamina D (Maxie, 2016).

El calostro de las vacas es rico en calcio (McGrath *et al.*, 2016). La adaptación crítica durante los primeros días de la lactancia se lleva a cabo mediante la liberación de PTH para reducir las pérdidas de calcio en la orina, la reabsorción de calcio de los huesos y el aumento de la síntesis de 1,25(OH) $_2D_3$ para mejorar el transporte intestinal activo de calcio (García, 2018), de modo que se desarrolla una hipocalcemia periparto en los animales que no pueden regular las demandas de calcio al inicio de la lactancia (Horst *et al.*, 1997). Al respecto, se ha descrito que la administración de 25(OH) D_3 antes del parto ayudar a mantener la homeostasis del calcio periparto en las vacas lecheras (Wilkens *et al.*, 2012).

Según trabajos de metaanálisis, la edad aumenta el riesgo de fiebre de la leche el 9% por lactancia (Lean *et al.*, 2006; DeGaris y Lean, 2008), de modo que las vacas más viejas tienen mayor riesgo a desarrollar hipo-

calcemia que las más jóvenes. Esto se ha asociado con una menor movilización de calcio del hueso (Van Mosel *et al.*, 1993) y probablemente una menor concentración de VDRs en el intestino delgado y tejidos, lo cual implica menor capacidad de respuesta a la 1,25-dihidroxit vitamina D (Horst *et al.*, 1990; Goff *et al.*, 1991). Cabe mencionar que las vacas son más dependientes de la absorción intestinal que de la resorción ósea para mantener la homeostasis del calcio (DeGaris y Lean, 2008).

Las células del sistema inmunitario innato juegan un papel importante en la liberación de la placenta (Gunnink, 1984; Kimura *et al.*, 2002). La hipocalcemia disminuye la motilidad uterina y la función de los neutrófilos, las cuales desempeñan un papel importante en el desprendimiento y la expulsión de la placenta. Por lo tanto, el aumento de las concentraciones séricas de calcio total durante el periodo crítico de 12 horas antes y después del parto debería disminuir su incidencia (Martinez *et al.*, 2012). Hajikolaei *et al.* (2021) encontraron que la administración preparto de colecalciferol vía oral redujo notablemente la incidencia de retención de placenta en vacas con bajas concentraciones séricas de $25(\text{OH})\text{D}_3$ alimentadas con una dieta acidogénica.

Relacionado a ello, Martinez *et al.* (2018) evaluaron el efecto de la alimentación con calcidiol durante las últimas semanas de gestación obteniendo una menor incidencia de metritis, retención de placenta y enfermedades peripartales, debido a un incremento del porcentaje de neutrófilos. Además, el calcidiol favorece los mecanismos de defensa en el útero que previenen la metritis al mejorar la función de las células inmunitarias y estimular la producción de PA por los leucocitos (Nelson *et al.*, 2012). También se observó que la administración subcutánea de calcitriol 6 horas después del parto redujo la incidencia de retención de placenta, metritis y morbilidad en vacas con una condición corporal (CC) mayor a 3.5 (escala 1-5), pero no se observaron cambios en vacas con $\text{CC} \leq 3.5$

al momento del parto (Vieira-Neto *et al.*, 2021). En síntesis, hay evidencia sobre los efectos de los metabolitos de la vitamina D_3 que indican una relación positiva en la prevención o mejor evolución de la retención de placenta y metritis en el ganado bovino.

Por otro lado, se reporta una menor concentración de vitamina D en vacas infectadas por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en comparación con animales en una etapa subclínica y no infectados (Stabel *et al.*, 2019). Además, esta patología es más común en bovinos de zonas con menor luz solar y, por lo tanto, con menores niveles de vitamina D (Hodnik *et al.*, 2020). Así mismo, Sorge *et al.* (2013) observaron una diferencia significativa en los niveles de vitamina D entre vacas que resultaron positivas y negativas para paratuberculosis a la prueba de ELISA, indicando que los niveles bajos de vitamina D podrían predisponer a la vaca a la infección por *M. avium paratuberculosis*. Esto debido a que en las últimas etapas de la enfermedad hay menor absorción de vitamina D en el intestino, y se utiliza más $25(\text{OH})\text{D}$ con el fin de mantener niveles adecuados de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ para modular la respuesta inmune en el intestino de animales con esta patología.

Las vacas Jersey tienen niveles más bajos de VDRs intestinales en comparación con las vacas Holstein (Goff *et al.*, 1995). Estos niveles bajos de VDRs intestinales alrededor del parto coincidieron con una mayor predisposición a la enfermedad de Johne o paratuberculosis poco después del parto, aumentando esta probabilidad con la edad del bovino (Goff *et al.*, 1995). Aunque estas observaciones son sólo circunstanciales, evidencian una posible asociación entre la vitamina D y la paratuberculosis.

En el estudio de García-Barragán *et al.* (2018) se observó que el calcitriol aumentó la capacidad microbicida de los macrófagos en casos de tuberculosis bovina mediante el aumento de la fagocitosis, la inhibición del crecimiento intracelular de *Mycobacterium*

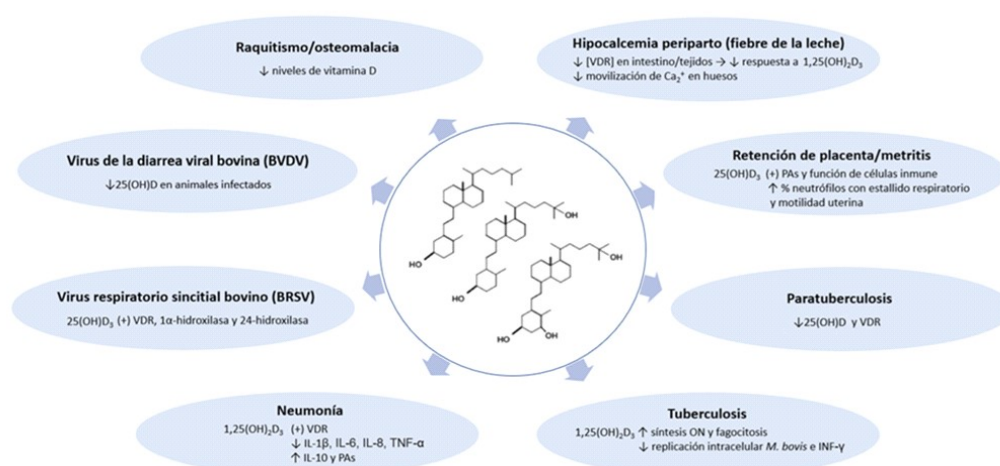


Figura 2. Evidencias que asocian a la vitamina D y sus metabolitos con patologías bovinas. Abreviaturas y simbología: (+): estimuló, (-): inhibió, (↑): aumentó, (↓): disminuyó, (→) a 1,25(OH)₂D₃: 1,25-dihidroxicolecalciferol, 25(OH)D₃: 25-hidroxicolecalciferol, INF-γ: interferón γ, IL-: interleucina-, ON: óxido nítrico, PA: péptidos antimicrobianos, TNF-α: factor de necrosis tumoral α, vitamina D₃: colecalciferol, VDR: receptor de vitamina D. Fuente: elaboración propia

bovis y la modulación de la producción de óxido nítrico (ON), un potente mecanismo antimicrobiano de los macrófagos activados. También hallaron que los macrófagos infectados o activados por LPS activan la vía de señalización de la vitamina D e inducen la expresión de la CYP27B1 y del VDR. Waters *et al.* (2001) coincidieron con García-Barragán *et al.* (2018) en cuanto a la modulación del ON por el calcitriol y además hallaron inhibición de la producción de interferón (IFN)-γ específico de *M. bovis* en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) infectadas con *M. bovis*, lo cual limitaría el daño tisular del huésped.

Asgharpour *et al.* (2020) observaron los efectos de la 1,25-dihidroxitamina D₃ sobre los signos clínicos y las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en terneros con neumonía experimental concluyendo que la vitamina D₃ moduló las respuestas inmunitarias innatas contra los patógenos mediante la activación del VDR. También

redujo los niveles de las citoquinas proinflamatorias IL-1β, IL-6, IL-8 y TNF-α y aumentó el nivel de la antiinflamatoria IL-10 24 horas después de la inyección de 1,25-dihidroxicolecalciferol, mejorando de esta forma la sintomatología clínica. Por otra parte, Sacco *et al.* (2012) examinaron los efectos de 25-hidroxitamina D₃ en terneros infectados experimentalmente con el virus respiratorio sincitial bovino (BRSV) encontrando que los niveles de expresión génica de citoquinas proinflamatorias (IFN-γ e IL-8) no se modificaron tras la activación de la vía de la vitamina D.

Nonnecke *et al.* (2014) encontraron una disminución del 51% de la concentración de 25(OH)D, a partir de la semana de la inoculación del virus, en terneros infectados experimentalmente con el virus de la diarrea bovina (BVDV), De acuerdo a los autores, esto puede deberse a que los terneros infectados con BVDV tenían anorexia, la disponibilidad de vitamina D en estos animales alimentados

con sustitutos de leche se había reducido sustancialmente, así como una mayor conversión intracrina de 25(OH)D₃ a 1,25(OH)₂D₃ por parte de las células inmunitarias debido a la expresión sostenida de CYP27B1.

En resumen, la vitamina D y sus metabolitos tienen un gran impacto en la patogenia de diversas enfermedades que afectan al ganado bovino (Figura 2), por lo cual resulta de utilidad considerar y mantener niveles adecuados de esta vitamina para promover el buen estado de salud de los animales. Hay coincidencia en varios estudios sobre los niveles bajos de 25(OH)D en animales enfermos, pero no queda claro si esta observación predispone o es una consecuencia de las patologías.

CONCLUSIONES

La función de la vitamina D en la homeostasis del calcio en las vacas lecheras se conoce desde hace muchos años. No obstante, considerando la existencia de los múltiples metabolitos circulantes en el organismo y los diversos modos de acción/regulación descriptos hasta el momento, es de esperar que estos esteroides hayan sido involucrados en funciones diferentes a la regulación cálcica. Los estudios recientes han aportado indicios de que la vitamina D es importante para la función de las células inmunitarias en las vacas lecheras y, por lo tanto, podría ser útil en la prevención y el tratamiento de enfermedades infecciosas como la mastitis. Los mecanismos de acción del dihidroxicolecalciferol o sus precursores indican que disminuye la invasión bacteriana, modula la respuesta inflamatoria (reduciendo los niveles de citoquinas proinflamatorias y aumentando los de antiinflamatorias) y regula la expresión de otros componentes de la respuesta inmunitaria innata como ser receptores tipo Toll, iNOS y PA en estudios *in vitro* e *in vivo* relacionados con mastitis. Las in-

vestigaciones futuras pueden dar respuestas sobre el efecto causal de la vitamina D en las enfermedades del ganado lechero y su uso en la terapéutica.

LITERATURA CITADA

1. **Alva-Murillo N, Téllez-Pérez AD, Medina-Estrada I, Álvarez-Aguilar C, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE. 2014.** Modulation of the inflammatory response of bovine mammary epithelial cells by cholecalciferol (vitamin D) during *Staphylococcus aureus* internalization. *Microb Pathogenesis* 77: 24-30. doi: 10.1016/j.micpath.2014.10.006
2. **Asgharpour P, Dezfouli MRM, Nadealian MG, Eftekhari Z, Borojeni GRN. 2020.** Effects of 1,25-dihydroxy vitamin D₃ on clinical symptoms, pro-inflammatory and inflammatory cytokines in calves with experimental pneumonia. *Res Vet Sci* 132 186-193. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.04.018
3. **Atalla H, Gyles C, Mallard B. 2011.** *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCVs) and their role in disease. *Anim Health Res Rev* 12: 33-45. doi: 10.1017/S1466252311000065
4. **Bandzaite V, Klimiene I, Špakauskas V, Matusevičius A. 2005.** Interaction between the levels of hormones and minerals in sera of healthy and sick cows. *Pol J Vet Sci* 8: 269-274.
5. **Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. 2006.** Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci* 89: 1877-1895. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72256-1
6. **Bikle D. 2009.** Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocr Metab* 94: 26-34. doi: 10.1210/jc.2008-1454
7. **Blanco A, Blanco G. 2016.** Química Biológica. 10° ed. Buenos Aires, Argentina: El Ateneo. 470 p.

8. **Bohl LP, Isaac P, Breser ML, Orellano MS, Correa SG, Tolosa de Talamoni NG, Porporatto, C. 2021.** Interaction between bovine mammary epithelial cells and planktonic or biofilm *Staphylococcus aureus*: The bacterial lifestyle determines its internalization ability and the pathogen recognition. *Microb Pathogenesis* 152:104604. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104604
9. **Bouillon R, Bikle D. 2019.** Vitamin D metabolism revised: fall of dogmas. *J Bone Miner Res* 34: 1985-1992. doi: 10.1002/jbmr.3884
10. **Callaby R, Hurst E, Handel I, Toye P, Bronsvort BM, Mellanby RJ. 2020.** Determinants of vitamin D status in Kenyan calves. *Sci Rep* 10: 20590. doi: 10.1038/s41598-020-77209-5
11. **Celi P, Williams S, Engstrom M, McGrath J, La Marta J. 2018.** Safety evaluation of dietary levels of 25-hydroxyvitamin D₃ in growing calves. *Food Chem Toxicol* 111 :641-649. doi: 10.1016/j.fct.2017.11.053
12. **Chin SF, Osman J, Jamal R. 2018.** Simultaneous determination of 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃ in human serum by ultra performance liquid chromatography: an economical and validated method with bovine serum albumin. *Clin Chim Acta* 485: 60-66. doi: 10.1016/j.cca.2018.-06.024
13. **Commission Implementing Regulation (EU). 2017.** Concerning the authorisation of cholecalciferol as a feed additive for all animal species. [Internet]. Disponible en: <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/eur169214.pdf>
14. **DeGaris PJ, Lean IJ. 2008.** Milk fever in dairy cows: a review of pathophysiology and control principles. *Vet J* 176: 58-69. DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.12.029
15. **Dittmer KE, Thompson KG. 2011.** Vitamin D metabolism and rickets in domestic animals: a review. *Vet Pathol* 48: 389-407. doi: 10.1177/03009858103-75240
16. **Eder K, Grundmann SM. 2022.** Vitamin D in dairy cows: metabolism, status and functions in the immune system. *Arch Anim Nutr* 76: 1-33. doi: 10.1080/1745039X.2021.2017747
17. **EMEA/MRL. 1998.** Committee for veterinary medicinal products, vitamin D, summary report. [Internet], Disponible en www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/vitamin-d-summary-report-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf
18. **Felipe V, Morgante CA, Somale PS, Varroni F, Zingaretti ML, Bachetti RA, Correa SG, et al. 2017.** Evaluation of the biofilm forming ability and its associated genes in *Staphylococcus* species isolates from bovine mastitis in Argentinean dairy farms. *Microb Pathogenesis* 104: 278-286. doi: 10.1016/j.micpath.2017.01.047
19. **Ferrari D, Lombardi G, Banfi G. 2017.** Concerning the vitamin D reference range: pre-analytical and analytical variability of vitamin D measurement. *Biochem Medica* 27: 030501. doi: 10.11613/BM.2017.030501
20. **Frutis-Murillo M, Sandoval-Carrillo MA, Alva-Murillo N, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE. 2019.** Immunomodulatory molecules regulate adhesin gene expression in *Staphylococcus aureus*: Effect on bacterial internalization into bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathogenesis* 131, 15-21. doi: 10.1016/j.micpath.2019.03.030
21. **García SA. 2018.** Fisiología veterinaria. Madrid: Tébar Flores. 720 p.
22. **García-Barragán Á, Gutiérrez-Pabello JA, Alfonseca-Silva E. 2018.** Calcitriol increases nitric oxide production and modulates microbicidal capacity against *Mycobacterium bovis* in bovine macrophages. *Comp Immunol Microb* 59: 17-23. doi: 10.1016/j.cimid.2018.-09.001
23. **Gardner RM, Reinhardt TA, Horst RL. 1988.** The biological assessment of vitamin D₃ metabolites produced by

- rumen bacteria. *J Steroid Biochem* 29: 185-189. doi: 10.1016/0022-4731(88)-90264-6
24. **Girgis CM, Brennan-Speranza TC. 2021.** Vitamin D and skeletal muscle: current concepts from preclinical studies. *JBMR Plus* 5: e10575. doi: 10.1002/jbm4.10575
 25. **Goff JP, Reinhardt TA, Horst RL. 1991.** Enzymes and factors controlling vitamin D metabolism and action in normal and milk fever cows. *J Dairy Sci* 74: 4022-4032. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78597-4
 26. **Goff JP, Reinhardt TA, Horst RL. 1995.** Milk fever and dietary cation-anion balance effects on concentration of vitamin D receptor in tissue of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 78: 2388-2394. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(95)76867-9
 27. **Gomes FP, Shaw PN, Whitfield K, Hewavitharana AK. 2015.** Simultaneous quantitative analysis of eight vitamin D analogues in milk using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 891: 211-220. doi: 10.1016/j.aca.2015.08.017
 28. **Gresham HD, Lowrance JH, Caver TE, Wilson BS, Cheung AL, Lindberg FP. 2000.** Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol* 164: 3713-3722. doi: 10.4049/jimmunol.164.7.3713
 29. **Gunnink JW. 1984.** Pre-partum leucocytic activity and retained placenta. *Vet Quart* 6: 52-54. doi: 10.1080/01652-176.1984.9693910
 30. **Hajikolaei MRH, Nouri M, Amirabadi SH, Shariari A, Constable PD. 2021.** Effect of antepartum vitamin D₃ (cholecalciferol) and postpartum oral calcium administration on serum total calcium concentration in Holstein cows fed an acidogenic diet in late gestation. *Res Vet Sci* 136: 239-246. doi: 10.1016/j.rvsc.2021.02.017
 31. **Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. 2007.** Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Quart* 29: 18-31. doi: 10.1080/01652176.2007.-9695224
 32. **Herrmann M, Farrell CJL, Pusceddu I, Fabregat-Cabello N, Cavalier E. 2017.** Assessment of vitamin D status - a changing landscape. *Clin Chem Lab Med* 55: 3-26. doi: 10.1515/cclm-2016-0264
 33. **Hewison M. 2010.** Vitamin D and the intracrinology of innate immunity. *Mol Cell Endocrinol* 321: 103-111. doi: 10.1016/j.mce.2010.02.013
 34. **Hibbs JW, Conrad HR. 1983.** The relation of calcium and phosphorus intake and digestion and the effects of vitamin D feeding on the utilization of calcium and phosphorus by lactating dairy cows. Ohio Agricultural Research and Development Center. Research Bulletin 1150.
 35. **Hidiroglou M, Karpinski K. 1989.** Providing vitamin D to confined sheep by oral supplementation vs ultraviolet irradiation. *J Anim Sci* 67: 794-802. doi: 10.2527/jas1989.673794x
 36. **Hodnik JJ, Ježek J, Stariè J. 2020.** A review of vitamin D and its importance to the health of dairy cattle. *J Dairy Res* 87: 84-87. doi: 10.1017/S00220299200-00424
 37. **Holcombe SJ, Wisnieski L, Gandy J, Norby B, Sordillo LM. 2018.** Reduced serum vitamin D concentrations in healthy early-lactation dairy cattle. *J Dairy Sci* 101: 1488-1494. doi: 10.3168/jds.2017-13547
 38. **Holick MF, MacLaughlin JA, Doppelt SH. 1981.** Regulation of cutaneous previtamin D₃ photosynthesis in man: skin pigment is not an essential regulator. *Science* 211: 590-593. doi: 10.1126/science.6256855
 39. **Holick MF. 1981.** The cutaneous photosynthesis of previtamin D₃: a unique photoendocrine system. *J Invest Dermatol* 77: 51-58. doi: 10.1111/1523-1747.ep12479237

40. **Holick MF. 2023.** The one-hundred-year anniversary of the discovery of the sunshine vitamin D₃: historical, personal experience and evidence-based perspectives. *Nutrients* 15: 593. doi: 10.3390/nu15030593
41. **Hollis BW, Napoli JL. 1985.** Improved radioimmunoassay for vitamin D and its use in assessing vitamin D status. *Clin Chem* 31: 1815-1819.
42. **Hollis BW, Roos BA, Draper HH, Lambert PW. 1981.** Vitamin D and its metabolites in human and bovine milk. *J Nutr* 111: 1240-1248. doi: 10.1093/jn/111.7.1240
43. **Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA. 1990.** Advancing age results in reduction of intestinal and bone 1,25-dihydroxy-vitamin D receptor. *Endocrinology* 126: 1053-1057. doi: 10.1210/endo-126-2-1053
44. **Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA. 1994.** Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. *J Dairy Sci* 77: 1936-1951. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(94)77140-X
45. **Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA. 1997.** Calcium and vitamin D metabolism during lactation. *J Mammary Gland Biol* 2: 253-263.
46. **Horst RL, Littledike ET. 1982.** Comparison of plasma concentrations of vitamin D and its metabolites in young and aged domestic animals *Comp Biochem Phys B* 73: 485-489. doi: 10.1016/0305-0491(82)90064-5
47. **Horst RL, Reinhardt TA. 1983.** Vitamin D metabolism in ruminants and its relevance to the periparturient cow. *J Dairy Sci* 66: 661-678. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(83)81844-X
48. **Hymøller L, Jensen SK. 2010.** Vitamin D(3) synthesis in the entire skin surface of dairy cows despite hair coverage. *J Dairy Sci* 93: 2025-2029. doi: 10.3168/jds.2009-2991
49. **Ismailova A, White JH. 2022.** Vitamin D, infections and immunity. *Rev Endocr Metab Dis* 23: 265-277. doi: 10.1007/s11154-021-09679-5
50. **Jüpelt RB, Didion T, Smedsgaard J, Jakobsen J. 2011.** Seasonal variation of provitamin D₂ and vitamin D₂ in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *J Agr Food Chem* 59: 10907-10912. doi: 10.1021/jf202503c
51. **Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. 2014.** Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. *J Lipid Res* 55:13-31. doi: 10.1194/jlr.R031534
52. **Kasalová E, Aufartová J, Krèmová LK, Solichová D, Solich P. 2015.** Recent trends in the analysis of vitamin D and its metabolites in milk - a review. *Food Chem* 171: 177-190. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.08.102
53. **Keane OM. 2019.** Symposium review: Intramammary infections - Major pathogens and strain-associated complexity. *J Dairy Sci* 102: 4713-4726. doi: 10.3168/jds.2018-15326
54. **Keefe G. 2012.** Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Vet Clin N Am-Food A* 28: 203-216. doi: 10.1016/j.cvfa.2012.03.010
55. **Kimura K, Goff JP, Kehrl ME, Reinhardt TA. 2002.** Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. *J Dairy Sci* 85: 544-550. doi: 10.3168/jds.S0022-0302-(02)74107-6
56. **Klein GB. 2014.** Cunningham. *Fisiología Veterinaria*. 5ª ed. Barcelona: Elsevier Health Sciences. 656 p.
57. **Kurjogi M, Issa Mohammad YH, Alghamdi S, Abdelrahman M, Satapute P, Jogaiah S. 2019.** Detection and determination of stability of the antibiotic residues in cow's milk. *PLoS One* 14: e0223475. doi: 10.1371/journal.pone.0223475
58. **Lean IJ, Degaris PJ, Celi P, McNeill DM, Rodney RM, Fraser DR. 2014.** Influencing the future: Interactions of skeleton, energy, protein and calcium during late gestation and early lactation. *Anim Prod Sci* 54: 1177-1189.

59. **Lean IJ, DeGaris PJ, McNeil DM, Block E. 2006.** Hypocalcemia in dairy cows: meta-analysis and dietary cation anion difference theory revisited. *J Dairy Sci* 89: 669-684. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72130-0
60. **Lippolis JD, Reinhardt TA, Sacco RA, Nonnecke BJ, Nelson CD. 2011.** Treatment of an intramammary bacterial infection with 25-hydroxyvitamin D(3). *PLoS One* 6: e25479. doi: 10.1371/journal.pone.0025479
61. **Littledike E, Horst R. 1980.** Problems with vitamin D injections for prevention of milk fever: toxicity of large doses and increased incidence of small doses. *J Dairy Sci* 63: 89.
62. **Machado M, Castro MB, Gimeno EJ, Barros SS, Riet-Correa F. 2020.** Enzootic calcinosis in ruminants: A review. *Toxicon* 187: 1-9. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.-08.009
63. **Makris K, Sempos C, Cavalier E. 2020.** The measurement of vitamin D metabolites: part I-metabolism of vitamin D and the measurement of 25-hydroxyvitamin D. *Hormones* 19: 81-96. doi: 10.1007/s42000-019-00169-7
64. **Martinez N, Risco CA, Lima FS, Bisinotto RS, Greco LF, Ribeiro ES, Maunsell F, et al. 2012.** Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *J Dairy Sci* 95: 7158-7172. doi: 10.3168/jds.2012-5812
65. **Martinez N, Rodney RM, Block E, Hernandez LL, Nelson CD, Lean IJ, Santos JEP. 2018.** Effects of prepartum dietary cation-anion difference and source of vitamin D in dairy cows: health and reproductive responses. *J Dairy Sci* 101: 2563-2578. doi: 10.3168/jds.2017-13740
66. **Mawer EB, Backhouse J, Holman CA, Lumb GA, Stanbury SW. 1972.** The distribution and storage of vitamin D and its metabolites in human tissues. *Clin Sci* 43: 413-431. doi: 10.1042/cs0430413
67. **Maxie MG. 2016.** Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of domestic animals. 6th ed. USA: Elsevier. 798 p.
68. **McDermott CM, Beitz DC, Littledike ET, Horst RL. 1985.** Effects of dietary vitamin D₃ on concentrations of vitamin and its metabolites in blood plasma and milk of dairy cows. *J Dairy Sci* 68: 1959-1967. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(85)-81057-2
69. **McGrath BA, Fox PF, McSweeney PL, Kelly AL. 2016.** Composition and properties of bovine colostrum: a review. *Dairy Sci Technol* 96: 133-158.
70. **Mello JRB. 2003.** Calcinosis—calcino-genic plants. *Toxicon* 41: 1-12. doi: 10.1016/s0041-0101(02)00241-6
71. **Merriman KE, Poindexter MB, Kweh MF, Santos JEP, Nelson CD. 2017.** Intramammary 1,25-dihydroxyvitamin D₃ treatment increases expression of host-defense genes in mammary immune cells of lactating dairy cattle. *J Steroid Biochem* 173: 33-41. doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.02.006
72. **Merriman KE, Powell JL, Santos JEP, Nelson CD. 2018.** Intramammary 25-hydroxyvitamin D₃ treatment modulates innate immune responses to endotoxin-induced mastitis. *J Dairy Sci* 101: 7593-7607. doi: 10.3168/jds.2017-14143
73. **Michigami T. 2017.** Update on recent progress in vitamin D research. *Vitamin D metabolism and its regulation. Clin Calcium* 27:1517-1523.
74. **Mizokami A, Kawakubo-Yasukochi T, Hirata M. 2017.** Osteocalcin and its endocrine functions. *Biochem Pharmacol* 132: 1-8. doi: 10.1016/j.bcp.2017.02.001
75. **[NRC] National Research Council. 2001.** Nutrient requirements of dairy cattle. [Internet]. Disponible en: https://profsite.um.ac.ir/~kalidari/software/NRC/HELP/NRC_2001.pdf
76. **Nelson CD, Lippolis JD, Reinhardt TA, Sacco RE, Powell JL, Drewnoski ME, O'Neil M, et al. 2016.** Vitamin D status of dairy cattle: outcomes of current practices in the dairy industry. *J Dairy Sci* 99: 10150-10160. doi: 10.3168/jds.2016-11727

77. **Nelson CD, Reinhardt TA, Beitz DC, Lippolis JD. 2010.** *In vivo* activation of the intracrine vitamin D pathway in innate immune cells and mammary tissue during a bacterial infection. *PloS One* 5: e15469. doi: 10.1371/journal.pone.0015469
78. **Nelson CD, Reinhardt TA, Lippolis JD, Sacco RE, Nonnecke BJ. 2012.** Vitamin D signaling in the bovine immune system: a model for understanding human vitamin D requirements. *Nutrients* 4: 181-196. doi: 10.3390/nu4030181
79. **Nonnecke BJ, McGill JL, Ridpath JF, Sacco RE, Lippolis JD, Reinhardt TA. 2014.** Acute phase response elicited by experimental bovine diarrhea virus (BVDV) infection is associated with decreased vitamin D and E status of vitamin-replete preruminant calves. *J Dairy Sci* 97: 5566-5579. doi: 10.3168/jds.2014-8293
80. **Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Carneiro C, Cavaco LM, Bernardo F, Vilela CL. 2006.** Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol* 118: 133-140. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.07.008.
81. **Oliver SP, Murinda SE. 2012.** Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *Vet Clin N Am-Food A* 28:165-185. doi: 10.1016/j.cvfa.2012.-03.005
82. **Prabhu AV, Luu W, Li D, Sharpe LJ, Brown AJ. 2016.** DHCR7: A vital enzyme switch between cholesterol and vitamin D production. *Prog Lipid Res* 64: 138-151.
83. **Qamar MU, Aatika, Chughtai MI, Ejaz H, Mazhari BBZ, Maqbool U, Alanazi A, et al. 2023.** Antibiotic-resistant bacteria, antimicrobial resistance genes, and antibiotic residue in food from animal sources: one health food safety concern. *Microorganisms* 11: 161. doi: 10.3390/microorganisms-11010161
84. **Rainard P. 2003.** The complement in milk and defence of the bovine mammary gland against infections. *Vet Res* 34: 647-670. doi: 10.1051/vetres:2003025
85. **Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, Maugeri NJ, Lincoln MR, Burrell A, Handunnetthi L, et al. 2010.** A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. *Genome Res* 1352-1360. doi: 10.1101/gr.107920.110
86. **Riollet C, Rainard P, Poutrel B. 2000.** Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. *Adv Exp Med Biol* 480: 247-258. doi: 10.1007/0-306-46832-8_30
87. **Rossi BF, Bonsaglia ECR, Castilho IG, Dantas STA, Salina A, Langoni H, Pantoja JCF, et al. 2019.** Genotyping of long term persistent *Staphylococcus aureus* in bovine subclinical mastitis. *Microb Pathogenesis* 132: 45-50. doi: 10.1016/j.micpath.2019.04.031
88. **Sacco RE, Nonnecke BJ, Palmer MV, Waters WR, Lippolis JD, Reinhardt TA. 2012.** Differential expression of cytokines in response to respiratory syncytial virus infection of calves with high or low circulating 25-hydroxyvitamin D₃. *PloS One* 7: e33074. doi: 10.1371/journal.pone.0033074
89. **Schmid A, Walther B. 2013.** Natural vitamin D content in animal products. *Adv Nutr* 4: 453-462. doi: 10.3945/an.113.003780
90. **Serrano Díaz N, Guío E, González A, Paredes LP, Cristina D, Lesmes Q, Becerra S. 2017.** Cuantificación de vitamina D: de la investigación a la práctica clínica. *Biosalud* 16: 67-79.
91. **Sommerfeldt JL, Napoli JL, Travis Littledike E, Beitz DC, Horst RL. 1983.** Metabolism of orally administered [3H] ergocalciferol and [3H] cholecalciferol by dairy calves. *J Nutr* 113: 2595-2600. doi: 10.1093/jn/113.12.2595
92. **Sordillo LM. 2018.** Mammary gland immunobiology and resistance to mastitis. *Vet Clin N Am-Food A* 34: 507-523. doi: 10.1016/j.cvfa.2018.07.005
93. **Sorge US, Molitor T, Linn J, Gallaher D, Wells SW. 2013.** Cow-level association between serum 25-hydroxyvitamin D concentration and *Mycobac-*

- terium avium* subspecies *paratuberculosis* antibody seropositivity: a pilot study. *J Dairy Sci* 96: 1030-1037. doi: 10.3168/jds.2012-5929
94. **Stabel JR, Reinhardt TA, Hempel RJ. 2019.** Short communication: Vitamin D status and responses in dairy cows naturally infected with *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis*. *J Dairy Sci* 102: 1594-1600. doi: 10.3168/jds.2018-15241
95. **Téllez-Pérez AD, Alva-Murillo N, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE. 2012.** Cholecalciferol (vitamin D) differentially regulates antimicrobial peptide expression in bovine mammary epithelial cells: implications during *Staphylococcus aureus* internalization. *Vet Microbiol* 160: 91-98. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.05.007.
96. **Thompson KG, Cook TG. 1987.** Rickets in yearling steers wintered on a swede (*Brassica napus*) crop. *New Zeal Vet J* 35: 11-13. doi: 10.1080/00480169.1987.35360.
97. **Tiraboschi G, Isaac P, Breser ML, Porporatto C, Bohl LP. 2021.** Vitamina D (calcitriol) estimula la fagocitosis de *Staphylococcus* spp aislados de bovinos con mastitis. *Rev Med Vet (B. Aires)* 101(2)
98. **Tomkins NW, Elliott R, McGrath JJ, Schatz T, Tomkins NW, Elliott R, McGrath JJ, Schatz T. 2020.** Managing plasma P concentrations in beef heifers with a slow release vitamin D supplementation. *Anim Prod Sci* 60: 610-617. doi: 10.1071/AN17601
99. **Van Mosel M, Van 't Klooster AT, Van Mosel F, Van Der Kuilen J. 1993.** Effects of reducing dietary [(Na⁺ + K⁺) - (Cl⁻ + SO₄⁼)] on the rate of calcium mobilisation by dairy cows at parturition. *Res Vet Sci* 54: 1-9. doi: 10.1016/0034-5288(93)-90002-w
100. **Vanderhaeghen W, Piepers S, Leroy F, Van Coillie E, Haesebrouck F, De Vliegher S. 2015.** Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. *Vet J* 203: 44-51. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.11.001
101. **Vieira-Neto A, Negro G, Zimpel R, Poindexter M, Lopes F, Thatcher WW, Nelson CD, et al. 2021.** Effects of injectable calcitriol on mineral metabolism and postpartum health and performance in dairy cows. *J Dairy Sci* 104: 683-701. doi: 10.3168/jds.2020-18448
102. **Voyich JM, Braughton KR, Sturdevant DE, Whitney AR, Saïd-Salim B, Porcella SF, Long RD, et al. 2005.** Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *J Immunol* 175: 3907-3919. doi: 10.4049/jimmunol.175.6.3907
103. **Wasserman RH. 1975.** Active vitamin D-like substances in *Solanum malacoxylon* and other calcinogenic plants. *Nutr Rev* 33: 1-5. doi: 10.1111/j.1753-4887.-1975.tb07074.x
104. **Waters WR, Nonnecke BJ, Rahner TE, Palmer MV, Whipple DL, Horst RL. 2001.** Modulation of *Mycobacterium bovis*-specific responses of bovine peripheral blood mononuclear cells by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 1204-1212. doi: 10.1128/CDLI.8.6.1204-1212.2001
105. **Webster J. 2020.** Understanding the dairy cow. 3th ed. Bristol: Wiley Blackwell. 140 p.
106. **Weir RR, Strain JJ, Johnston M, Lowis C, Fearon AM, Stewart S, Pourshahidi LK. 2017.** Environmental and genetic factors influence the vitamin D content of cows' milk. *P Nutr Soc* 76: 76-82. doi: 10.1017/S002966511-6000811
107. **Wen G, Eder K, Ringseis R. 2020.** 1,25-hydroxyvitamin D₃ decreases endoplasmic reticulum stress-induced inflammatory response in mammary epithelial cells. *PloS One* 15: e0228945. doi: 10.1371/journal.pone.0228945

- 108. Wilkens MR, Oberheide I, Schröder B, Azem E, Steinberg W, Breves G 2012.** Influence of the combination of 25-hydroxyvitamin D₃ and a diet negative in cation-anion difference on peripartal calcium homeostasis of dairy cows. *J Dairy Sci* 95: 151-164. doi: 10.3168/jds.2011-4342
- 109. Yue Y, Hymøller L, Jensen SK, Lauridsen C, Purup S. 2017.** Effects of vitamin D and its metabolites on cell viability and *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells. *Vet Microbiol* 203: 245-251. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.03.008
- 110. Yue Y, Hymøller L, Jensen SK, Lauridsen C. 2018.** Effect of vitamin D treatments on plasma metabolism and immune parameters of healthy dairy cows. *Arch Anim Nutr* 72: 205-220. doi: 10.1080/1745039X.2018.1448564
- 111. Zemleni J, Rucker RB, McCormick DB, Suttie JW. 2007.** Handbook of vitamins. 4th ed. Florida, USA: Elsevier. 605 p.
- 112. Zerwekh JE. 2008.** Blood biomarkers of vitamin D status. *Am J Clin Nutr* 87: 1087S-1091S. doi: 10.1093/ajcn/87.4.1087S