

**Regional
Jataí**



UFG
UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS



VALDIR CHIOGNA JUNIOR

**METIONINA PROTEGIDA NO DESEMPENHO DE VACAS
LEITEIRAS DE ALTA PRODUÇÃO**

**Jataí-GO
2018**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/96, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese
2. Identificação da Tese ou Dissertação:

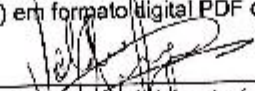
Nome completo do autor: Valdir Chiogna Junior

Título do trabalho: Metionina Protegida no Desempenho de Vacas Leiteiras de Alta Produção

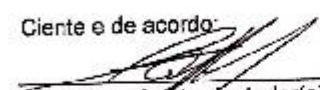
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☐ SIM ☒ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 17 / 12 / 2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro

² A assinatura deve ser escaneada.

VALDIR CHIOGNA JUNIOR

**METIONINA PROTEGIDA NO DESEMPENHO DE VACAS LEITEIRAS DE ALTA
PRODUÇÃO**

Prof. Dr. Edgar Alain Collao Saenz
Orientador

Dissertação apresentada ao Programa de
Biociência Animal da Universidade Federal de
Goiás, Regional Jataí, como pré-requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em
Biociência Animal.

**JATAÍ-GO
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Chiogna Junior, Valdir
Metionina Protegida no Desempenho de Vacas Leiteiras de Alta
Produção [manuscrito] / Valdir Chiogna Junior. - 2018.
xii, 47 f.

Orientador: Prof. Dr. Edgar Alain Collao Saenz.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade
Acadêmica Especial de Biociência, Programa de Pós-Graduação em
Biociência Animal, Jataí, 2018.
Bibliografia. Anexos.
Inclui abreviaturas, gráfico, tabelas.

1. aminoácidos. 2. produção de leite. 3. produção de proteína. I.
Collao Saenz, Edgar Alain, orient. II. Título.

CDU 635



Universidade Federal de Goiás
Regional Jataí
Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal

Ata de Defesa Pública de Dissertação de Mestrado

Ao décimo dia do mês de dezembro de 2018, às 14:00 horas, no prédio da Pós-Graduação da Regional Jataí da Universidade Federal de Goiás, iniciaram-se os trabalhos referentes à Defesa Pública de Dissertação de Mestrado do candidato **VALDIR CHIOGNA JUNIOR**, com o trabalho intitulado **"METIONINA PROTEGIDA NO DESEMPENHO DE VACAS LEITEIRAS DE ALTA PRODUÇÃO"**. A Banca Examinadora, constituída pelos(as) membros: Prof. Dr. Edgar Alain Collao Saenz (Orientador), Prof.^a Dr.^a Fernanda Lopes (Membro Externo), Prof.^a Dr.^a Márcia Dias (Membro Interno), considerou o candidato, Valdir Chiogna Junior: **APROVADO (X) REPROVADO ()**.

Foi concedido um prazo de 30 dias, para o candidato efetuar as correções sugeridas pela Banca Examinadora e entregar o trabalho em sua redação definitiva. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca.



Prof. Dr. Edgar Alain Collao Saenz
Orientador/Presidente



Prof.ª Dr.ª Márcia Dias
Membro Interno



Prof.ª Dr.ª Fernanda Lopes
Membro Externo

AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre clareou meu caminho, e renova minhas esperanças quando estou cansado.

À minha esposa Renata que esteve sempre ao meu lado em todos os nossos projetos, com muito companheirismo e paciência. À nossa filha Alice que chegou junto com este desafio, nos enchendo de alegria e vida. Ao nosso filho Miguel que está a caminho nos trazendo mais felicidade. Com vocês, meu mundo fica completo!

Ao meu orientador e agora amigo prof. Dr. Edgar pela confiança, paciência e dedicação. Sem sua ajuda e ensinamentos não teria sido possível.

À Dra. Fernanda Lopes que sempre esteve disposta a me ajudar, sendo peça fundamental deste projeto.

À meus pais Valdir (*in memoriam*) e Elza, que me ensinaram as lições mais importantes da vida, e à toda minha família, em especial ao meu irmão Alessandro pela confiança de sempre e por abrir as portas da Fazenda Santa Carla para o projeto.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram ou torceram por mim.

“The price of light is less than the cost of darkness”
(Arthur C. Nielsen)

METIONINA PROTEGIDA NO DESEMPENHO DE VACAS LEITEIRAS DE ALTA PRODUÇÃO

Resumo: O aumento da disponibilidade de metionina em dietas de vacas leiteiras durante o início da lactação pode melhorar seu desempenho e saúde. O objetivo deste experimento foi determinar o efeito da suplementação de metionina protegida da degradação ruminal (MPDR) no desempenho de vacas lactantes do início até a primeira metade da lactação. Setenta e seis vacas foram blocadas aleatoriamente em dois grupos por produção de leite e dias em lactação. A MDPR foi adicionada à dieta tratamento (SM) para alcançar uma relação LIS:MET de 3:1 na proteína metabolizável (PM). A duração do experimento foi de 12 semanas, incluindo 2 semanas de covariável e 10 de período experimental. Amostras de leite foram coletadas a cada duas semanas e analisadas quanto aos componentes do leite. A suplementação de metionina resultou em maior produção de leite (41,7 vs. 40,1 kg/d; $P = 0,03$), ECM (41 vs. 38 kg/d; $P < 0,01$), porcentagem de proteína do leite (3,14 vs. 2,94%; $P < 0,01$), rendimento de proteína (1,30 vs. 1,19 kg/d; $P < 0,01$), porcentagem de caseína (2,39 vs. 2,28%; $P < 0,01$), rendimento da gordura (1,42 vs. 1,29 kg/d; $P = 0,02$), e rendimento de sólidos totais (5,01 vs. 4,75 kg/d; $P = 0,05$) e apresentou uma tendência para maior porcentual de gordura (3,41 vs. 3,21%; $P = 0,06$). O grupo controle apresentou maior porcentual de lactose (4,61 vs. 4,54%; $P = 0,03$) e tendência a maior ECC (3,4 vs. 3,3; $P = 0,08$). Não houve efeito em CMS, rendimento de lactose, porcentagem de sólidos totais, NUL e CCS. Os efeitos da suplementação de MPDR sugerem que dietas comuns usadas no Brasil para vacas de alta produção, podem ser melhoradas se balanceadas por aminoácidos, especialmente quando a relação LIS:MET é ajustada de acordo com a recomendação do NRC, e pode ser uma opção para melhorar a eficiência das vacas leiteiras.

Palavras-chave: aminoácidos, produção de leite, proteína do leite

RUMEN PROTECTED METHIONINE SUPPLEMENTATION ON PERFORMANCE OF HIGH PRODUCTION DAIRY COWS

Abstract: Increasing methionine availability in dairy cow diets during early lactation may increase performance and lead to healthy benefits. The objective of this experiment was to determine the effect of supplementing rumen protected methionine (RPMet) on lactating cows performance from the beginning to the first half of lactation. Seventy-six cows were blocked into two randomized groups by milk yield and days in milk. Supplemented RPMet was added to the treatment diet (SM) to achieve a LYS:MET ratio of 3:1 in metabolizable protein (MP). The duration of the experiment was 12 weeks, including 2 weeks of covariate and 10 weeks experimental period. Milk samples were collected every two weeks and analyzed for milk components. MET supplementation increased milk yield (41.7 vs. 40.1 kg/d; $P = 0.03$), ECM (41 vs. 38 kg/d; $P < 0.01$), milk protein percentage (3.14 vs. 2.17%; $P < 0.01$), milk protein yield (1.30 vs. 1.19 kg/d; $P < 0.01$), milk casein percentage (2.39 vs. 2.28%; $P < 0.01$), milk fat yield (1.42 vs. 1.29 kg/d; $P = 0.02$), total solids yield (5.01 vs. 4.75 kg/d; $P = 0.05$) and showed a tendency for higher milk fat percentage (3.41 vs. 3.21%; $P = 0.06$). The control group had greater milk lactose percentage (4.61 vs. 4.54%; $P = 0.03$) and a tendency for greater BCS (3.4 vs. 3.3; $P = 0.08$). There was no effect for DMI, milk lactose yield, total solids percentage, MUN and SCC. The RPMet supplementation effects suggests that common diets used in Brazil for high producing cows can be improved if balanced by amino acids, notably when LYS:MET ratio is adjusted according to NRC recommendation, being an option to upgrade dairy cow efficiency.

Key words: amino acids, milk protein, milk yield, rumen protected methionine.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	2
1. INTRODUÇÃO	2
2. REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1. Proteína	4
2.2. PDR e PNDR	5
2.3. Aminoácidos	6
2.3.1. Metionina	8
2.3.2. Metionina e metabolismo	9
2.4. Outros AA	11
2.5. Interação nutrição x ambiente	12
2.6. Saúde da vaca	12
2.7. Consumo de matéria seca (CMS)	13
2.8. Produção de leite	14
2.9. Produção de sólidos	19
2.9.1. Proteína	19
2.9.2. Gordura	19
2.10. Reprodução	20
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
4. REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 2	30
Rumen protected methionine supplementation on performance of high production dairy cows	30
INTRODUCTION	31
MATERIALS AND METHODS	32
Animal Housing and Care	32
Experimental Design and Treatment Diets	32
Sampling and measurements	35
Statistical Analysis	35
RESULTS AND DISCUSSION	36
Milk Yield	38
Milk Components	40
CONCLUSION	42
REFERENCES	43

LISTA DE ABREVIATURAS

REVISÃO

AA	Aminoácidos
AAE	Aminoácidos essenciais
AANE	Aminoácidos não essenciais
ARG	Arginina
ATP	Adenosina trifosfato
BHBA	Beta-hidroxibutirato
CMS	Consumo de matéria seca
CNCPS	Cornell Net Carbohydrate and Protein System
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EM	Energia metabolizável
FSR	Taxa de fosforilação da proteína
GH	Hormônio do crescimento
GM	Glândula mamária
HIS	Histidina
HOT	Teoria da oxidação hepática
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo-1
ILE	Isoleucina
kd	Taxa de degradação
kp	Taxa de passagem
LEU	Leucina
LFI	Índice de funcionalidade do fígado
LIS	Lisina
LPL	Lipoproteína lipase
Mcal	Mega caloria
MDPR	Metionina protegida da degradação ruminal
MET	Metionina
miRNA	Micro-RNA
mTOR	Rapamicina
N	Nitrogênio

OAA	Oxaloacetato
PB	Proteína bruta
PB	Proteína bruta
PDR	Proteína degradável no rúmen
PHE	Fenilalanina
PM	Proteína metabolizável
Pmic	Proteína microbiana
PNDR	Proteína não degradável no rúmen
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
S	Enxofre
SAM	S-adenosilmetionina
TAG	Triglicerídeo
TCA	Ácido tri-carboxílico
THR	Treonina
TRP	Triptofano
VAL	Valina
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

ARTIGO

AA	Amino acids
ADF	Acid detergent fiber
AOAC	Official Methods of Analysis
BCS	Body condition score
BHBA	Beta-hydroxybutyrate acid
BW	Body weight
Ca	Calcium
CNCPS	Cornell Net Carbohydrate and Protein System
CON	Control diet
CP	Crude protein
DIGAA	Digestible amino acids
DIM	Days in milk
DMI	Dry matter intake
DNA	Deoxyribonucleic acid
EAA	Essential amino acids

ECM	Energy corrected milk
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid dipotassium salt dihydrate
EE	Ether extract
GH	Growth hormone
HIS	Histidine
HOT	Hepatic oxidation theory
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
LFI	Liver functionality index
LPL	Lipoprotein lipase
LYS	Lysine
Mcal	Mega calories
ME	Metabolizable energy
MET	Methionine
MG	Mammary gland
miRNA	Micro-RNA
MP	Metabolizable protein
mTOR	Rapamycin
MUN	Milk urea nitrogen
N	Nitrogen
NDF	Neutral detergent fiber
NEAA	Non essential amino acids
OAA	Oxaloacetate
P	Phosphorus
RDP	Rumen degradable protein
RNA	Ribonucleic acid
RPMet	Rumen protected methionine
RUP	Rumen undegradable protein
SAM	S-adenosylmethionine
SCC	Somatic cell count
SD	Standard deviation
SM	Treatment diet
TAG	Triacylglycerol
TMR	Total mix ration
VLDL	Very low-density lipoprotein

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A pesquisa na área de nutrição de vacas em lactação está em constante evolução, sendo que, a suplementação de precisão de proteína vem ganhando atenção, com base nas frações protéicas degradáveis e não-degradáveis dos alimentos, e mais recentemente, nas exigências de aminoácidos. A otimização no uso de proteínas e aminoácidos (AA) em vacas leiteiras desempenha um papel significativo na sustentabilidade das fazendas e pode ser o principal custo dentro das dietas.

Desde a publicação do NRC (2001), o modo de formular dietas para vacas leiteiras tem sido continuamente renovado tanto para satisfazer as exigências convencionais de nutrientes, como também para balancear as dietas para os dois principais aminoácidos (AA) limitantes – metionina (MET) e lisina (LIS). Os resultados científicos com AA nas últimas décadas foram fundamentais para o desenvolvimento de softwares que incluam suas exigências em modelos nutricionais, solidificando os princípios da proteína ideal em um sistema robusto e funcional.

Há duas maneiras de atender as exigências de AA em bovinos: a primeira é baseada no balanceamento de AA com os alimentos disponíveis para formulação, e a segunda opção é a utilização de AA protegidos da degradação ruminal. Atualmente, dietas para vacas leiteiras podem ser formuladas para assegurar uma utilização mais eficiente da proteína, otimizando o rendimento e os componentes do leite, particularmente a proteína.

Os fatores que influenciam a produção de sólidos são de interesse para os produtores e nutricionistas devido a ênfase colocada pela indústria na produção de proteína e gordura, sendo estes fatores, componentes importantes na precificação do leite pago ao produtor, pois seus teores tem impacto no resultado econômico da indústria. Na América do Sul, o balanceamento de AA na dieta vem sendo muito discutido nos últimos cinco anos, mas ainda não é amplamente utilizado no campo.

O uso de estratégias de nutrição mais precisas, baseadas em nutrientes específicos, tem crescido recentemente, e nesta corrente, o balanceamento de aminoácidos como a metionina, tem sido estudada por parecer ser o principal aminoácido limitante em dietas convencionais a base de milho e farelo de soja. Outra

corrente que vem ganhando força, é a ambiental, com a manipulação da dieta na tentativa de otimizar a utilização de nitrogênio (N) e reduzir sua excreção. A nutrição de precisão minimiza o fornecimento em excesso de nutrientes, que acabam sendo excretados via fezes, urina ou leite. O balanceamento de aminoácidos, permite uma formulação com menos proteína, e consequentemente melhora a utilização de N pelo animal, sem perder desempenho, reduzindo eliminação de contaminantes (LEE et al., 2012a).

A metionina pode também ser efetiva em aumentar o consumo de matéria seca em vacas em início de lactação, contribuindo para maior aumento de produção e pico de lactação, além de melhorar saúde das vacas no período de transição (ZHOU et al., 2016a). Outro efeito benéfico seria a melhora do desempenho reprodutivo de vacas leiteiras, principalmente na redução de perdas gestacionais no terço inicial (KOELEMAN, 2016).

Em geral, analisando o retrospecto das pesquisas, quando alguns aminoácidos passam a não ser mais limitantes nas dietas de vacas leiteiras, é esperado aumento de componentes do leite, melhoria de desempenho produtivo, saúde e fertilidade, e embora as primeiras respostas à suplementação de AA sejam em concentração de proteína no leite, nota-se uma variedade de efeitos que sugerem que o balanceamento de aminoácidos permite as vacas serem capazes de expressar melhor seu potencial genético.

O objetivo do trabalho é avaliar o desempenho de vacas no terço inicial de lactação quando suplementadas com metionina. A revisão visa dar embasamento teórico sobre nutrição protéica e balanceamento de aminoácidos, em especial metionina, na formulação de dietas para vacas leiteiras.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Proteína

Proteínas são macromoléculas biológicas compostas de uma ou mais cadeias longas de AA, unidos por ligações peptídicas. Participam de praticamente todos os processos celulares, atuam como enzimas, catalisadores de reações químicas, transporte de pequenas moléculas ou íons e podem ser ainda motoras para auxiliar no movimento em células e tecidos, além de participarem dos processos de regulação gênica, sistema imunológico, bem como centenas de outras funções (LEHNINGER et al., 1999).

Originalmente, o valor da proteína dos alimentos é determinado contabilizando a concentração de N na matéria seca e contando com uma concentração média de N em proteínas (16%) para calcular a proteína bruta ($PB = N \times 6,25$). A proteína bruta inclui não apenas a proteína verdadeira, mas também os ácidos nucléicos, nitratos, amônia e outros compostos nitrogenados, como AA e pequenos peptídeos. Nos ruminantes as proteínas são degradadas no rúmen em múltiplos passos: primeiramente são quebradas em cadeias menores de AA chamados oligopeptídeos; então, estes são divididos em peptídeos menores e, finalmente, em aminoácidos (NRC, 2001).

Devido à população microbiana no rúmen, os ruminantes podem extrair energia de carboidratos fibrosos e transformar fontes de baixa qualidade de proteína ou nitrogênio não-proteico em proteína microbiana de alta qualidade. No entanto, os microorganismos do rúmen têm a primeira oportunidade de digerir a proteína verdadeira da dieta, o que complica a capacidade de entender e quantificar o suprimento de aminoácidos para a vaca leiteira e os requisitos para seus fins metabólicos, mesmo usando modelos nutricionais modernos. A nutrição protéica do rúmen e da vaca está intrinsecamente ligada à nutrição de carboidratos que, sincronicamente, otimizam a eficiência do uso de nitrogênio (ZANTON, 2017)

Embora o balanço de PB e nitrogênio ainda tenha um papel importante nas fazendas pensando em manejo de nutrientes nos alimentos, do ponto de vista nutricional, o conceito de PB foi superado, uma vez que a nutrição protéica de vacas leiteiras ultrapassou o uso de PB na dieta como um nutriente-alvo e agora está focada

em atender as necessidades de amônia para fermentação ruminal, síntese de proteína microbiana e, exigências de AA da vaca (SCHWAB; BRODERICK, 2017).

2.2. PDR e PNDR

As fontes de proteína que chegam ao intestino dos ruminantes são: a proteína microbiana (Pmic), a proteína não degradável no rúmen (PNDR) e a proteína endógena. Os aminoácidos oriundos da digestão dessas fontes é denominada proteína metabolizável (PM). Os requerimentos ruminais para substratos de N são considerados em termos de proteína degradável no rúmen (PDR) e, as exigências de AA são consideradas em termos de proteína metabolizável (PM), que é definida como “a proteína verdadeira digerida pós-ruminalmente e o componente AA absorvido pelo intestino” (NRC, 2001).

A proteína degradável no rúmen (PDR) é a fração da PB consumida que é utilizada pelos microorganismos do rúmen. Esta degradação ocorre através da ação de enzimas secretadas pelos microorganismos ruminais (proteases, peptidases e deaminases), que utilizam peptídeos, AA e amônia para multiplicação celular e síntese de proteína microbiana (Pmic). A Pmic é normalmente a maior fonte de PM no intestino de ruminantes, podendo representar de 45 a 55% da PM em vacas leiteiras de alta produção (SANTOS, 2006).

A predição de Pmic e fluxo de PNDR no rúmen é de fundamental importância em dietas de vacas leiteiras, pois estes fluxos compõem a maioria do suprimento de PM e afetam a composição de AA absorvida no trato digestivo. Estimativas mais precisas dessas variáveis permitem melhor eficiência animal e redução da excreção de N (WHITE et al., 2017).

A degradabilidade da proteína em qualquer dieta ou alimento específico depende tanto do alimento em si quanto de particularidades do indivíduo alimentado. Quando a taxa de passagem da dieta pelo rúmen é mais lenta, a porção degradável pode ser maior. Experimentos mostram que uma deficiência de PDR em vacas leiteiras pode diminuir a digestibilidade da fibra e o CMS, pela menor oferta de amônia às bactérias fibrilolíticas (ALLEN, 2000; LEE et al., 2012a; GIALLONGO et al., 2015)

O fluxo de PNDR é determinado pela combinação entre taxa de passagem (kp) e taxa de degradação (kd) da PB proveniente do rúmen, portanto determinar a fração degradável e não degradável no rúmen da proteína, é uma etapa importante para

entender o suprimento de PM para atender os requerimentos da vaca. Os aminoácidos que chegam ao intestino como PM são determinados tanto por esse fluxo de proteína alimentar que escapa do rúmen como PNDR, quanto pela proteína microbiana (Pmic), proteína endógena proveniente da própria vaca e da composição de AA dessas proteínas (ZANTON, 2017).

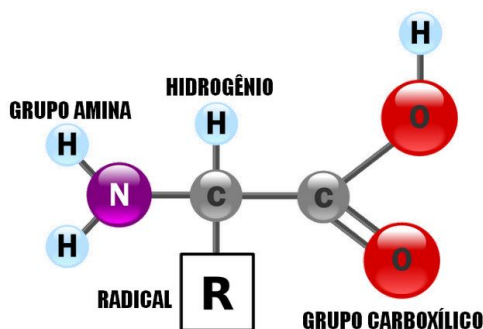
O aumento de PNDR por si em dietas de vacas leiteiras não melhora o desempenho da lactação, principalmente se houver decréscimo de PDR e resultar em redução do fluxo de PMic para o duodeno. Os nutrientes essenciais para a vaca leiteira são os aminoácidos, que são fornecidos tanto pela digestão da proteína microbiana produzida no rúmen quanto pelas fontes de proteína alimentar verdadeira que escapa do rúmen. Não haverá um aumento substancial nos fluxos de proteína total, aminoácidos essenciais (AAE), ou LIS e MET para o duodeno se a síntese microbiana for limitada por PNDR alto e PDR baixo. A adequação de PNDR e PDR em dietas para vacas em lactação deve ser considerada independentemente. Não é recomendável aumentar a PNDR em detrimento da PDR, a menos que a PDR seja excessiva, para que não haja redução da produção de Pmic. Portanto, entende-se que a composição de AA e a digestibilidade intestinal do PNDR determinarão seu valor nutricional para o animal (SANTOS et al., 1998; SCHWAB & BRODERICK, 2017).

A porção PNDR pode fornecer uma fração considerável do AA exigido pela vaca, embora seja geralmente menos de 50% do fluxo de AA para o intestino. Dados sobre o perfil de AA fornecidos por alimentos individuais indicam que o perfil de AA muitas vezes não é ideal para a exigência da vaca e que uma mistura de fontes de proteína com diferentes perfis geralmente resulta em melhor produção. Embora essas fontes de alimentação de AA possam resultar na variabilidade do perfil de AA fluindo pós-ruminalmente, o fluxo de proteína microbiana oferece uma fonte mais consistente de AA com um perfil de alta qualidade. Assim, otimizar o fluxo de proteína microbiana do rúmen é uma estratégia importante para o balanceamento de AA para vacas leiteiras (ZANTON, 2017).

2.3. Aminoácidos

Aminoácidos são as unidades estruturais das proteínas, que são construídas de acordo com informações de códigos genéticos, para atender os requerimentos do organismo. Existem centenas de moléculas que atendem a definição de aminoácido, ou seja, contêm um grupo amina e um ácido carboxílico (Figura 1), mas somente 20

AA são codificados geneticamente. Os aminoácidos que a vaca consegue sintetizar, e portanto não são requeridos via dieta para serem absorvidos são denominados não essenciais (AANE), enquanto os necessários para suportar funções e produtividade normais são denominados essenciais (AAE). De acordo com o NRC (2001), em ruminantes, os AEE são: arginina (ARG), histidina (HIS), isoleucina (ILE), leucina (LEU), lisina (LIS), metionina (MET), fenilalanina (PHE), treonina (THR), triptofano (TRP), e valina (VAL).



Fonte: Biomedicina padrão

Figura 1. Estrutura química básica de um aminoácido.

Os AA tem ampla variedade de funções bioquímicas no organismo variando desde troca de nitrogênio (N) entre tecidos, doação de grupo metil, atuação como neurotransmissor, regulação da síntese de proteína, e sinalizações específicas (ZANTON, 2017).

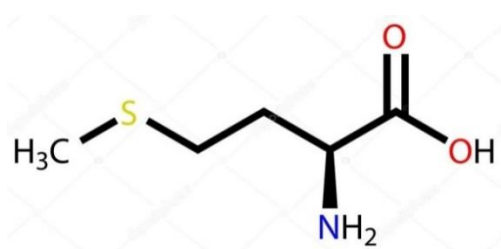
Quando formulamos dietas para aminoácidos, devemos levar em consideração que a eficiência do uso de AA não é constante, como é frequentemente representado nos modelos nutricionais. A glândula mamária e outros tecidos respondem ao suprimento de AA e podem regular a extração e a oxidação destes. Outro ponto importante é que, semelhante à energia, o requerimento de manutenção de proteína deve ser atingido antes dos requerimentos de produção, portanto estes são importantes fatores que podem levar a variação nas respostas a aminoácidos no desempenho de vacas leiteiras. O estágio da lactação também pode ser muito significativo na determinação da direção do uso de AA. Imediatamente após o parto, há uma forte priorização anabólica do AA em relação à síntese de proteínas, embora a demanda por síntese de glicose também seja muito alta. (GALINDO et al., 2015)

Outras informações são necessárias para um bom balanceamento de AA, como ter uma análise de composição nutricional representativa utilizando métodos

laboratoriais consistentes com o modelo nutricional escolhido. As forrageiras são os ingredientes mais variáveis na dieta e devem ser analisadas com mais frequência do que as fontes de concentrado. Atualmente tem se tornado mais comum a análise da composição de aminoácidos dos alimentos para uma maior precisão no seu balanceamento. As vacas leiteiras requerem AA nas quantidades apropriadas para otimizar a saúde, reprodução e produção, independentemente da política econômica da indústria.

2.3.1. Metionina

A metionina é um aminoácido essencial, portanto não pode ser sintetizado pelo organismo, sendo necessário ser consumido via dieta. É considerado o primeiro AA limitante em dietas de vacas leiteiras, principalmente quando compostas basicamente de silagem de milho e farelo de soja, e a sua suplementação melhora o desempenho geral da lactação em vacas leiteiras (ARMENTANO; BERTICS; DUCHARME, 1997). É o único aminoácido essencial sulfurado (Figura 2), sendo importante precursor de outros AA que contêm enxofre (S) como cisteína, homocisteína e taurina, importantes antioxidantes celulares. Dos quatro AA que contém enxofre, apenas metionina e cisteína são incorporados às proteínas (BROSNAN; BROSNAN, 2006).



Fonte: Biomedicina padrão

Figura 2. Estrutura química de uma molécula de metionina.

A cisteína, por sua capacidade de formar ligações dissulfeto, desempenha papel crucial na estrutura protéica. O metabolismo da metionina começa com sua ativação para a S-adenosilmetionina (SAM), que é um cofator chave do metabolismo intermediário da MET, usado nas reações de metilação, podendo doar seu grupo metil a uma ampla variedade de receptores, como resíduos de aminoácidos em proteínas, DNA, RNA e pequenas moléculas. A SAM é considerada uma molécula notavelmente versátil, sendo reconhecida como a segunda mais exigida por enzimas, perdendo

apenas para o ATP. A S-adenosil-homocisteína, que é um produto destas metiltransferases, dá origem à homocisteína. A homocisteína pode ser remetilada em metionina ou convertida em cisteína pela via de transulfuração. A metionina também pode ser metabolizada por uma via de transaminação. A cisteína pode ser convertida em produtos importantes como glutatona e taurina, dois dos mais importantes antioxidantes celulares (BROSAN; BROSAN, 2006). A taurina está presente em muitos tecidos em concentrações mais elevadas do que qualquer um dos outros aminoácidos, como em neutrófilos, onde é o AA livre mais abundante no citosol (SHIMADA et al., 2015).

2.3.2. Metionina e metabolismo

Os requerimentos nutricionais em vacas secas aumentam conforme a gestação avança, pelo aumento do crescimento fetal e suas exigências (NRC, 2001). Condições como aumento de glicocorticóides no sangue, mobilização de gordura corporal e tamanho do feto contribuem para redução do consumo de matéria seca (CMS), portanto a quantidade de proteína metabolizável proveniente tanto da dieta, quanto da proteína microbiana diminuem pela queda de CMS ao redor do parto, desta forma, a nutrição da vaca periparturiente é de extrema importância para o bom desempenho da vaca e bezerro (OSORIO et al., 2013).

O início da lactação é caracterizado pelo balanço negativo de energia e proteína, causado não só pelo baixo consumo de matéria seca, mas também pela alta demanda da glândula mamária neste período (DRACKLEY, 1999). Consequentemente, o aumento da mobilização de proteína corporal durante este período, pode em parte, compensar a quantidade insuficiente de doadores metil requeridos pela glândula mamaria e fígado (KOMARAGIRI; ERDMAN, 1997), que estão em intensa atividade neste momento. Esta fase também é caracterizada pela alta exigência de compostos metilados no leite, no entanto, as fontes de grupo metil estão escassas (ZHOU et al., 2016a).

A suplementação de doadores metil protegidos como metionina protegida da degradação rumenal (MPDR) pode ajudar a atingir os requerimentos de vacas lactantes e com isso melhorar saúde e desempenho principalmente durante o período de transição (OSORIO et al., 2013; OSORIO et al., 2014). Um adequado perfil e quantidade de aminoácidos essenciais (AAE) é crucial não só para o sucesso no

período de transição, mas também durante o pico de produção com consequente otimização da lactação (BATISTEL et al., 2017).

No período de transição a disponibilidade de metionina para produção de leite, metabolismo hepático de gordura e sistema imune pode ser limitante (OSORIO et al., 2013), e a suplementação de metionina no periparto em dietas com adequada lisina na proteína metabolizável (PM), encontrando uma relação ajustada para 3:1, pode ser benéfica, uma vez que a suplementação de metionina tem mostrado melhora no desempenho de vacas lactantes (ARMENTANO; BERTICS; DUCHARME, 1997; OSORIO et al., 2013)

O NRC (2001) sugere como quantidade ótima de lisina e metionina na dieta, para otimizar produção de proteína no leite, 7,2 e 2,4% respectivamente, da proteína metabolizável. Atingir estes níveis se torna difícil sem fornecer altas quantidades de proteína na dieta, o que se torna oneroso e desnecessário. A partir disso se recomendou como primeiro degrau no balanceamento de lisina (LIS) e metionina (MET), que se mantenha a relação entre estes aminoácidos em 3:1 respectivamente, considerando teores em níveis mais práticos, de aproximadamente 6,6 e 2,2% da PM (SCHWAB et al., 2003).

Van Amburg et al. (2015) na atualização do modelo CNCPS ver. 6.5, sugerem uma relação LIS:MET de 2,7:1 (7,00 e 2,60% da PM) e 2,4:1 (6,77 e 2,85 % da PM) para maximizar o rendimento de proteína do leite e o teor de proteína do leite, respectivamente. Normalmente, as recomendações para balanceamento de AA são feitas em relação à oferta total de PM, mas dados anteriores sugerem ser mais apropriado considerar a oferta de AA em relação à energia metabolizável (EM) para melhorar a produtividade e a eficiência do uso de nutrientes. Esta abordagem sugere como a relação ótima entre AA e energia 1,14 e 3,03 g AA / Mcal EM para MET e LIS, respectivamente (HIGGS, 2014).

A quantidade de AAE na dieta é importante para síntese de proteína no leite, mas a relação entre eles é mais importante para aumentar o rendimento de proteína no leite. (HAQUE et al., 2015; GAO et al., 2017). De acordo com Nan et al. (2014) a relação entre lisina e metionina (LIS:MET) tem significativa influência na expressão de genes relacionados à transcrição e tradução da proteína do leite (caseína) nas células epiteliais mamárias no bovino.

2.4. Outros AA

A lisina é geralmente identificada como o primeiro AA limitante em dietas de vacas em lactação que contêm alta inclusão de milho, silagem de milho, ou de coprodutos de milho (SCHINGOETHE et al., 2009), mas seu requerimento pode ser facilmente atingido quando farelo de soja é utilizado na dieta. Outros AA podem limitar ou co-limitar a produção de proteína do leite e a produção de leite em vacas leiteiras. Uma metanálise recente (LEAN et al., 2017) demonstra efeito positivo da metionina e da histidina como aminoácidos co-limitantes em vacas leiteiras e sugere que a leucina, o triptofano e a treonina devem ser considerados em pesquisas futuras. Demais AA como arginina, isoleucina, triptofano e fenilalanina foram citados nesta meta-análise como tendo um papel importante no metabolismo lácteo, seja diretamente ou como precursores de outros componentes ou aminoácidos, mas os autores admitem não existir ainda, dados concretos de estudos sobre vacas em lactação, que podem fornecer subsídios para recomendações.

A histidina (HIS) mostrou ter um efeito positivo sobre o CMS e pode aumentar a produção e componentes do leite quando suplementada em combinações com MET e LIS em vacas alimentadas com dietas pobres em PM (GIALLONGO et al., 2016). No geral, a alimentação deficiente em HIS na PM teve efeitos negativos no CMS e no desempenho lactacional de vacas leiteiras (GIALLONGO et al., 2015, 2017). Lapierre et al. (2008) reforçam a idéia de que os requisitos de HIS devem ser semelhantes aos requisitos de MET, embora também chamem a atenção para a grande variabilidade nos requisitos recomendados para HIS (de 2,4 a 3,2% de MP) provavelmente relacionados à contribuição potencial da carnosina, um dipeptídeo contendo HIS, como fonte deste aminoácido.

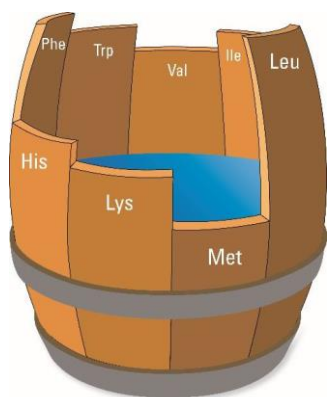


Figura 3. Deficiência de AA em dietas tradicionais sem suplementação ou balanceamento segundo a hipótese de von Liebig.

2.5. Interação nutrição x ambiente

Nos últimos anos, a indústria leiteira no mundo vem sofrendo pressão para usar recursos com mais eficiência, reduzir a excreção de nitrogênio ou fósforo e as emissões de componentes orgânicos voláteis. A manipulação da dieta reduzindo teor de proteína é uma ótima estratégia, não só para reduzir emissões de N, mas também ser economicamente mais atrativa ao produtor (HRISTOV et al., 2011; LEE et al., 2012a).

Inúmeras pesquisas observaram redução de excreção de N urinário e amônia fecal em vacas alimentadas com concentrações reduzidas de proteína. Em alguns estudos a redução de proteína bruta (PB) não teve efeito na produção de leite (LEONARDI; STEVENSON; ARMENTANO, 2003; COLMENERO; BRODERICK, 2006), ou sequer houve redução de proteína no leite (LEE et al., 2012a). A suplementação com metionina protegida da degradação ruminal (MPDR) pode ser uma eficiente estratégia para minimizar os efeitos deletérios do suprimento de dietas com baixa proteína (BRODERICK et al., 2008), mantendo desempenho e ainda otimizando a utilização e reduzindo excreção de nitrogênio pelo animal (CHEN et al., 2011).

2.6. Saúde da vaca

O índice LFI (liver functionality index), sugerido por Bertoni e Trevisi (2013), representa um parâmetro de avaliação da saúde metabólica de vacas em transição, medida por mudanças em biomarcadores associados com síntese de albumina no plasma, síntese de lipoproteínas como colesterol, e catabolismo de bilirrubina. Vacas com LFI baixo sugerem uma resposta inflamatória exacerbada e um perfil de AA circulantes menos favorável (TREVISI et al., 2012). Vacas com alto índice LFI tem menor incidência de desordens de saúde e melhora do desempenho na lactação, incluindo maior CMS. Quando MPDR é suplementada, foram observados resultados de melhora neste índice, sugerindo uma transição mais suave e melhor status imunometabólico (ZHOU et al., 2017).

A suplementação de doadores de radical metil, como MET, podem suprir o requerimento diário e melhorar saúde e produção de vacas leiteiras em período de transição. Além do mais, MET é considerada um agente lipotrópico, ou seja, aumenta o transporte e metabolismo dos lipídeos, incluindo a síntese de lipoproteínas pelo fígado e sua absorção por tecidos extra-hepáticos, estando portanto diretamente envolvido na síntese de lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL). Como um doador metil, MET melhora a síntese de S-adesilmetionina (SAM), que vai produzir fosfatidilcolina, que é a membrana envoltória do VLDL, importante para que este composto seja exportado do fígado, reduzindo acúmulo de triglicerídeos (TAG) no fígado e evitando consequentemente a esteatose hepática (MARTINOV et al., 2010).

No estudo de Osorio et. al. (2013) a suplementação de MPDR resultou em aumento de produção de leite, porcentagem de proteína no leite, leite corrigido para energia e produção de gordura. Também foi observado aumento da capacidade de fagocitose dos neutrófilos, sugerindo melhora do sistema imune, além de tendência em redução de casos de cetose no pós parto.

2.7. Consumo de matéria seca (CMS)

Grande parte dos benefícios observados com a suplementação de metionina durante o período de transição foram devidos a melhora da imunidade e maior consumo de matéria seca (ZHOU et al., 2016b; OSORIO et al., 2014). Porém, o efeito em CMS em estudos prévios mostra resultados inconsistentes. Alguns estudos justificam esta inconsistência pela quantidade e qualidade da metionina suplementada. De acordo com a meta análise de Patton (2010) proveniente de 35 estudos, fatores como nível de suplementação, presença de aminoácidos co-limitantes, duração da suplementação, estágio da lactação, podem interferir na resposta dos experimentos. Já a meta-análise de Zanton, Bowman e Rode (2014), com 64 estudos, mostra a fonte de metionina protegida como uma importante causa da diferença de consumo, sendo que a suplementação via DL-Metionina, promoveu maior consumo frente a suplementação com Etil-celulose e seus respectivos controles.

Existem divergências nas respostas de consumo, alguns trabalhos não demonstraram incremento em consumo, quando MPDR foi suplementada (ORDWAY et al., 2009; PREYNAT et al., 2009; CHEN et al., 2011; LEE et al., 2015; GIALLONGO

et al., 2016). Porém outros estudos demonstraram aumento significativo em CMS quando houve suplementação de metionina (OSORIO et al., 2013; SUN et al.; 2016; ZHOU et al., 2016b; BATISTEL et al., 2017). O aumento em CMS observado em alguns estudos pode ser, em parte, explicado pela redução da inflamação e estresse oxidativo, que leva o animal a um melhor estado imuno-metabólico e melhor funcionamento do fígado (OSORIO et al., 2014; ZHOU et al., 2016c). Ainda de acordo com estes autores, o aumento da disponibilidade de MET, aumenta o substrato para síntese de glutathione, que é o mais abundante e importante antioxidante no fígado, e este efeito é extremamente importante, principalmente no período de transição.

Como agente lipotrópico, a metionina aumenta a síntese e exportação de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) do fígado, evitando acúmulo de TAG no órgão (MARTINOV et al., 2010). Além de esteatose hepática, o acúmulo de triglicerídeos no fígado, de acordo com a teoria da oxidação hepática (HOT) proposta por Allen et al. (2005); Allen e Bradford (2006) pode reduzir CMS no período de transição por aumentar a oxidação de combustíveis no fígado, entre eles os triglicerídeos.

A HIS também tem mostrado influência no CMS e sua inclusão em dietas tem sido recomendada para ter quantidade similar à de metionina. Isso foi sugerido por Lapiere et al. (2008) e Lee et al. (2012) baseado no metabolismo similar destes dois aminoácidos nos tecidos hepáticos e mamários. De acordo com o NRC (2001), a concentração de metionina e histidina no leite também é similar (5.5% dos AAE). Experimentos tem mostrado que HIS é outro AA limitante em vacas leiteiras alimentadas com dietas baseadas em silagem de milho (LAPIERRE et al., 2008; LEE et al., 2012; GIALLONGO et al., 2015). Giallongo et al. (2017) observaram que dietas deficientes em HIS, mesmo em adequada quantidade de MET, LIS e proteína metabolizável, afetaram negativamente o desempenho lactacional de vacas leiteiras, pois a deficiência de HIS pode reduzir CMS, sugerindo este aminoácido como co-limitante na produção de vacas leiteiras.

2.8. Produção de leite

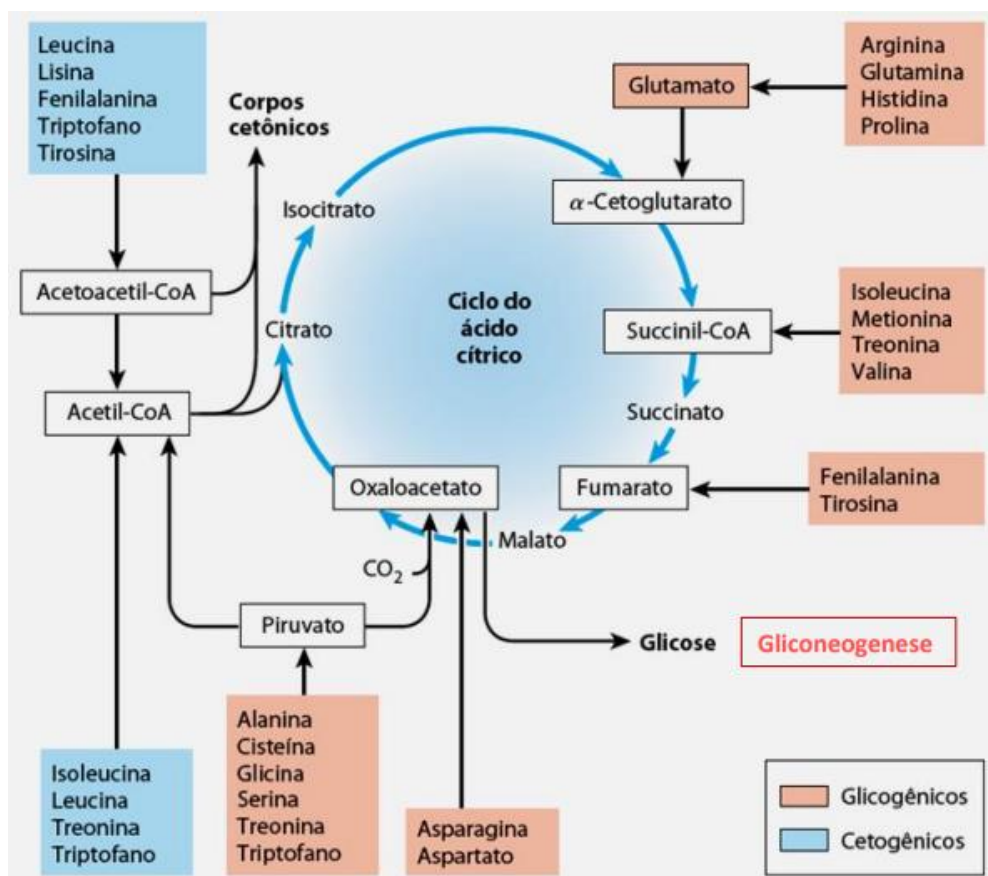
Diversos trabalhos demonstraram incremento em produção de leite quando da suplementação de MPDR (OSORIO et al., 2013; ZHOU et al., 2016b; BATISTEL et

al., 2017). Em outros estudos no entanto, não foram encontrados respostas em volume produzido (ORDWAY et al., 2009; PREYNAT et al., 2009).

O principal componente regulador de volume de leite é a lactose, um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e outra de galactose. Lactose é o principal regulador osmótico do leite (50%), que também é influenciado por citrato, íons e proteínas. Pela estreita relação entre síntese de lactose e quantidade de água drenada para o leite, sua concentração é a menos variável dentre os componentes do leite (HURLEY, 2012).

Aminoácidos podem contribuir para síntese de lactose, ácidos graxos ou produção de ATP via ciclo do ácido tri carboxílico (TCA cycle) no processo de gliconeogênese (VERSCHUREN, 1998), embora esta participação não seja expressiva. Parte dos aminoácidos pode ser desaminada e servir como fonte de energia, fato importante em fetos em desenvolvimento, onde há grande participação de AA para formação de glicose (BELL; SLEPETIS; EHRHARDT, 1995). Quando a demanda por energia é maior que por AA, o fígado desamina o excesso de aminoácidos. Uma porção deste N é reciclado via saliva, mas parte é excretado via urina e leite, podendo aumentar a excreção de N no ambiente (NRC, 2001).

A metionina é considerada um AA glicogênico, podendo entrar no ciclo do ácido tri carboxílico (Figura 4) através de succinil-CoA, contribuindo para oxaloacetato (OAA) mitocondrial, maior ponto de entrada de substratos gliconeogênicos à gliconeogênese. Como grande parte da glicose necessária para produção de lactose na glândula mamária é proveniente de gliconeogênese (ASCHENBACH et al., 2010) muito especula-se sobre a importância da metionina no aumento da gliconeogênese hepática e consequente contribuição no aumento do volume de leite.



Fonte: <http://www.fcav.unesp.br>

Figura 4. Ciclo do ácido tri carboxílico (TCA cycle)

Embora MET possa servir como um aminoácido glicogênico, segundo Larsen e Kristensen (2013), este AA não é priorizado para a produção de glicose, e a contribuição quantitativa de aminoácidos essenciais ao carbono glicogênico é menos de 2,5% em vacas leiteiras de transição. Conforme discutido em estudo de Galindo et al. (2015) as vacas tem outras prioridades metabólicas de processos biológicos fundamentais como síntese protéica, metilação de DNA, reações de trans-metilação dependentes de SAM, formação de poliaminas, síntese de glutathiona, fosfatidilcolina e o aminoácido não essencial cisteína. Pressupõe-se que a prioridade biológica para estes fins, supere o uso da MET para gliconeogênese hepática.

Os resultados do trabalho de Zhang et al. (2016) indicaram que o aumento da suplementação de MET em hepatócitos primários de bovinos não é direcionado ao aumento da síntese de glicose, provavelmente devido a estas outras prioridades metabólicas. No trabalho ainda foi demonstrado que o aumento crescente das concentrações de MET não regularam os principais genes glicogênicos, mas os autores concluem que ainda é necessário mais estudos para elucidar a possível

prioridade metabólica para o aumento das concentrações de MET em hepatócitos bovinos. Galindo et al. (2015) ainda presumem que em vacas em lactação inicial, o aumento do suprimento de AA não é direcionado para aumento da gliconeogênese hepática, provavelmente por causa da alta demanda anabólica para AA, comuns nesta fase da lactação.

Em contrapartida, há evidências de importante interação entre AA e energia. Em estudo para entender melhor a necessidade da glândula mamária (GM) para diferentes tipos de AA e como a GM altera seu metabolismo em resposta a oferta variável de AA, Doepel e Lapierre (2010) observaram resposta positiva em produção de leite e proteína quando AAE foram suplementados, mas o mesmo não aconteceu com suplementação de AANE. A captação de glicose na GM não aumentou para suportar o aumento da produção de leite com AAE, mas aumentou a absorção de beta-hidroxibutirato (BHBA) e ácido láctico, enquanto a captação de glicose pela GM tendeu a ser maior com tratamentos AANE. Em contraste, o aumento de todos os EAA na GM aumentou quando os AAE foram infundidos. O aumento na produção de leite no tratamento com AAE sem aumento na captação de glicose, mas com aumento na captação de outros substratos produtores de energia, além de AA, demonstra a prioridade metabólica da produção de leite e a flexibilidade da GM em utilizar diversos substratos à sua disposição.

Quando há aumento da oferta de proteína, pode haver aumento nos rendimentos de proteína e lactose no leite. Este aumento da lactose nem sempre é paralelo a um aumento no incremento da captação de glicose mamária, mas está associado a uma maior captação de aminoácidos de cadeia ramificada. Embora AA sejam utilizados para a gliconeogênese, *in vitro*, alguns AA essenciais podem contribuir para a síntese de lactose pelas células mamárias, sugerindo que a glicose arterial não seria o único precursor da lactose do leite (BEQUETTE et al., 2005)

Seguindo este conceito, Maxin et al. (2013) avaliando interações entre AA e o metabolismo da glicose em vacas leiteiras recebendo diferentes misturas de AA, observaram que a glicose arterial não seria o único precursor de lactose no leite, e que outras fontes de carbono poderiam contribuir para a síntese de galactose, sugerindo que AA poderiam estar envolvidos na síntese de lactose no leite. Estima-se que até 12% da síntese de galactose pode ser derivado do catabolismo de AEE e há evidências do papel destes na síntese de grandes quantidades de AANE, e talvez até

certo ponto, no metabolismo para fornecer esqueletos de carbono para a síntese de lactose (BEQUETTE; SUNNY; OWENS, 2006).

Bequette e Nelson (2006) destacam que no início da lactação, quando a demanda de glicose para síntese de lactose é alta, e a oferta de precursor de glicose (via propionato) é baixa, a partição de carbono de AA para a gliconeogênese é provavelmente vital. Considerando que o metabolismo de ruminantes é orquestrado para poupar glicose não é surpresa que a contribuição do carbono de AA para a gliconeogênese tenha sido estimada no fígado, a partir dos resultados do balanço líquido e radiomarcador, em 12 a 35%.

Outra possível relação entre a suplementação de MET e o aumento do rendimento de leite foi o aumento de hormônio do crescimento (GH) observado em vacas suplementadas com MPDR no periparto por Osorio et al. (2013). Durante a lactação, o GH não só aumenta a produção de leite mas também estimula a gliconeogênese hepática e síntese de IGF1, portanto, postula-se a possibilidade de que genes relacionados ao eixo GH-IGF1 poderiam ser modulados pela suplementação de MET. No entanto, os mecanismos pelos quais a suplementação de MPDR aumenta a produção de leite, ainda não são totalmente compreendidas. OSORIO et al. (2013), atribuíram a maior produção de leite em parte pelo maior consumo de matéria seca e otimização do uso de lipídeos de reserva corporal mobilizados.

Da mesma forma, SUN et al. (2016) concluíram que além do maior consumo, que aliviou o balanço energético negativo, houve melhor modulação do metabolismo hepático dos lipídeos, melhorando saúde e desempenho das vacas. Em trabalho mais recente (BATISTEL et al., 2017) o maior CMS das vacas, levando a maior consumo de energia, não reduziu o balanço energético negativo, em relação ao grupo controle, porém tal fato era esperado, pelo aumento em produção de leite e proteína no leite das vacas suplementadas com MPDR. O aumento da eficiência energética, segundo os autores, foi em parte devido a redução da demanda energética pelo sistema imune, que conforme já relatado, se mostra mais eficiente quando MET é suplementada. Há aumento expressivo do uso de glicose pelo sistema imune ativo, podendo levar a um estado de hipoglicemia e, dependendo da intensidade e à priorização energética do animal para atender as demandas imunológicas (KVIDERA et al., 2017).

2.9. Produção de sólidos

2.9.1. Proteína

A proteína do leite é composta de cerca de 80% de caseína e 20% de proteínas do soro (β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, soroalbumina, e imunoglobulinas), sendo considerada uma proteína de alto valor nutricional para o ser humano e um importante indicador de qualidade do leite (BIONAZ; HURLEY; LOOR, 2012). É estimado que mais de 90% da proteína do leite (com exceção da soroalbumina e imunoglobulinas) seja sintetizada *de novo* pelas células epiteliais na glândula mamária através de AA livres extraídos da circulação (BACKWELL et al., 1996).

Os AA não servem somente como precursores diretos de síntese protéica, mas também atuam como reguladores da taxa dessa síntese. A suplementação de MPDR aumenta a porcentagem de proteína no leite (ORDWAY et al., 2009; OSORIO et al., 2013; SUN et al., 2016; ZHOU et al., 2016a). A magnitude do aumento da proteína ocorre em proporção direta a adequação de MET na proteína metabolizável (NRC, 2001). A quantidade de AAE é importante para a síntese de proteína no leite, mas o balanço de AA na dieta é mais importante para aumentar o rendimento deste componente (HAQUE et al., 2015; GAO et al., 2017).

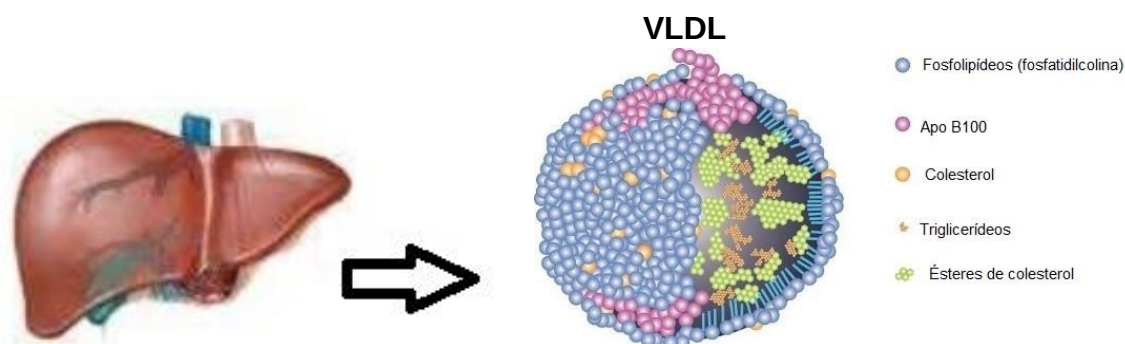
A síntese protéica é sensível a sinalização de MET e rapamicina (mTOR), uma proteína quinase que regula a síntese de proteínas, o que pode explicar porque vacas lactantes alimentadas com dietas a base de silagem de milho normalmente respondem positivamente a suplementação com MPDR. A metionina pode ainda exercer efeito na velocidade de FSR (taxa de sinalização de fosforilação de proteína), que não é mediada pela mTOR (APPUHAMY et al., 2012). De acordo com Nan et al. (2014), a relação LIS:MET tem influência significativa na expressão da caseína nas células epiteliais mamárias dos bovinos, e o pico de concentração de caseína quando a relação LIS:MET de 3:1 é atendida, é devida em parte, via regulação da expressão de RNAm e mTOR.

2.9.2. Gordura

O efeito da suplementação de MET na regulação da síntese de gordura no leite ainda precisa ser melhor investigada. Pesquisas mostram aumento na produção total

de gordura, carregado pelo aumento no volume de leite, porém sem aumento em porcentagem de gordura (ZHOU et al., 2016a; BATISTEL et al., 2017).

A metionina é um agente lipotrópico, envolvida na síntese de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), através da geração de S-adenosilmetionina (SAM), o mais importante doador de metil (MARTINOV et al., 2010), que por sua vez pode ser usado para formação de fosfatidilcolina, que é a membrana que reveste a VLDL (Figura 5), facilitando sua formação e exportação do fígado (ZOM et al., 2011). Os ácidos graxos de 18 carbonos e alguns de 16 carbonos, que compõem de 40 a 60% da gordura do leite, provém quase totalmente de VLDL. Na glândula mamária, o VLDL é ancorado ao endotélio pela lipoproteína lipase (LPL), que então hidrolisa TAG no núcleo da lipoproteína para liberar ácido graxo (BIONAZ; LOOR, 2008).



Fonte: Biomedicina padrão adaptado

Figura 5. Exportação de gordura do fígado via VLDL

No estudo de Li et al. (2016) foi observada positiva regulação de genes lipogênicos e mudanças na expressão do miRNA envolvidas no balanço do controle lipogênico, que são indicativos de um potencial papel importante na relação entre os AAE e sinalização da mTOR na regulação da síntese de gordura no leite. Porém mais estudos sobre este mecanismo precisam ser feitos para melhor compreensão do potencial dos AAE na expressão gênica lipogênica.

2.10. Reprodução

Pesquisas na área de reprodução são consistentes na idéia de que sua eficiência pode ser alterada por modificações na dieta e em estratégias nutricionais. Em relação a metionina, Toledo et al. (2017) observaram que após a alimentação com MPDR houve um aumento no tamanho embrionário e na manutenção da gestação em

vacas multíparas. Um estudo de Peñagaricano et al. (2013) mostrou que uma dieta materna rica em grupos de doadores metil podem alterar a expressão de genes associados com resposta imune, ainda em embriões pré implantados. Nesta fase, os embriões ainda não possuem sistema imunológico próprio, portanto a expressão embrionária precoce desses genes podem ser um importante passo na diferenciação embrionária, pois podem ter implicações a longo prazo na sobrevivência e saúde do concepto.

Embriões pré implantados coletados de vacas suplementadas com metionina, tiveram maior conteúdo lipídico, aumentando a capacidade de sobrevivência do embrião. Há fortes evidências de que as reservas lipídicas endógenas servem como substrato energético (ACOSTA et al., 2016).

Jacometo et al. (2016) avaliando possíveis mudanças na expressão gênica de fígados de neonatos provenientes de vacas suplementadas com metionina no final da gestação, observaram que os descendentes sofreram uma maturação mais rápida da gliconeogênese e oxidação de ácidos graxos no fígado, o que seria vantajoso para se adaptar às demandas metabólicas da vida extra-uterina.

O estado nutricional materno durante a gestação, influencia o metabolismo, crescimento e desenvolvimento do feto, bem como sua susceptibilidade à doenças. Desta forma, aminoácidos como metionina, histidina, serina e glicina, bem como vitaminas (ácido fólico, vitamina B12, B6 e B2), importantes no metabolismo do 1-carbono, o qual é vital para metilação de DNA, tem importante papel na programação maternal do metabolismo dos descendentes, regulando crescimento e saúde através de mecanismos epigenéticos (JI et al., 2016).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o balanceamento de dietas com aminoácidos em vacas leiteiras seja objeto de pesquisa há décadas, são ainda necessários mais dados experimentais a fim de definirmos as reais exigências não só de metionina, mas de todos os aminoácidos essenciais. Pela particularidade do rúmen e seu metabolismo, a suplementação de AA se torna um desafio. O maior conhecimento sobre as funções da metionina no metabolismo, principalmente energético, é crucial não só para o ajuste do perfil das dietas, como também para o aprimoramento de modelos nutricionais e softwares de formulação de dietas.

Os benefícios da suplementação de metionina na saúde de vacas em lactação, principalmente em período de transição, são bastante contundentes, mas as respostas em produção de leite são muito variáveis, e grande parte desta inconsistência nas respostas se deve talvez à composição da dieta, necessidade de melhor predição de fluxo intestinal, absorção e utilização dos aminoácidos no metabolismo.

No balanceamento protéico de dietas, os aminoácidos são os nutrientes requeridos pelas vacas, e não a proteína bruta. Garantir suprimento de PDR no rúmen e aminoácidos no intestino é fundamental para o desempenho lactacional. Os aminoácidos tem numerosas e importantes funções no metabolismo, e seu correto suprimento fornece oportunidades significativas de minimizar o risco de deficiências de AA, reduzindo a necessidade de excesso de PNDR na dieta, garantindo otimização da saúde, produção e lucratividade do rebanho leiteiro.

Nos últimos anos, foram geradas novas e intrigantes informações sobre o papel dos AAE no metabolismo de ruminantes, não somente sua disponibilidade para uso anabólico, mas também no seu envolvimento em várias vias metabólicas que servem de funções importantes no metabolismo de proteínas e energia, gliconeogênese, ácidos graxos e na síntese mamária da proteína do leite e lactose. A definição e quantificação do envolvimento dos AAE nestas outras vias, devem, no futuro, possibilitar considerações importantes nos perfis de alimentação de rebanhos leiteiros.

4. REFERÊNCIAS

- ACOSTA D.A.; DENICOL A.C.; TRIBULO P.; RIVELLI M.I.; SKENANDORE C.; ZHOU Z. Effects of rumen-protected methionine and choline supplementation on the preimplantation embryo in Holstein cows. **Theriogenology**; 85(9):1669–79, 2016.
- ALLEN, M.S.; BRADFORD, B. J.; HARVATINE, K. J. The cow as a model to study food intake regulation. **Ann. Rev. Nutr.** 25:523-547, 2005.
- ALLEN, M.S. and BRADFORD, B. J. From the liver to the brain: increasing feed intake in transition cows. Pp. 115-124. Proc. **68th Meeting of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, Department of Animal Science**, Cornell University, Ithaca, NY 14850, 2006.
- ALLEN, M. S. Effects of Diet on Short-Term Regulation of Feed Intake by Lactating Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1598–1624, 2000.
- APPUHAMY, J. A. D. R. N., KNOEBEL. N. A., NAYANANJALIE, W. A. D., ESCOBAR, J., HANIGAN, M. D. Isoleucine and Leucine Independently Regulate mTOR Signaling and Protein Synthesis in MAC-T Cells and Bovine Mammary Tissue. **The Journal of Nutrition**. Slices 1 , 2. n. 9, 2012.
- ARMENTANO, L. E.; BERTICS, S. J.; DUCHARME, G. A. Response of Lactating Cows to Methionine or Methionine Plus Lysine Added to High Protein Diets Based on Alfalfa and Heated Soybeans. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 6, p. 1194–1199, 1997.
- ASCHENBACH, J. R.; KRISTENSEN, N. B.; DONKIN, S. S.; HAMMON, H. M.; PENNER, G. B. Gluconeogenesis in dairy cows: The secret of making sweet milk from sour dough. **IUBMB Life**, v. 62, n. 12, p. 869–877, 2010.
- BACKWELL, F. R; BEQUETTE, B. J; WILSON, D.; METCALF, J. A.; FRANKLIN, M. F.; BEEVER, D. E.; LOBLEY, G. E.; MACRAE, J. C. Evidence for the utilization of peptides for milk protein synthesis in the lactating dairy goat in vivo. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 271: R955–R960, 1996.
- BATISTEL, F., ARROYO, J. M., BELLINGERI, A.; WANG, L.; SAREMI, B.; PARYS, C.; TREVISE, E.; CARDOSO, F. C. Ethyl-cellulose rumen-protected methionine enhances performance during the periparturient period and early lactation in Holstein dairy cows. **Jornal of Sairy Science**. p. 1–13, 2017.
- BELL, A. W.; SLEPETIS, R.; EHRHARDT, U. A. Growth and Accretion of Energy and Protein in the Gravid Uterus During Late Pregnancy in Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 9, p. 1954–1961, 1995.
- BEQUETTE, B. J.; NELSON, K. The Roles of Amino Acids in Milk Yield and Components. **Animal Science**, 2006.
- BEQUETTE, B. J.; SUNNY, N. E.; OWENS, S. L. Application of stable isotopes and mass isotopomer distribution analysis to the study of intermediary metabolism of nutrients The online version of this article , along with updated information and services, is located on the World Wide Web at : Applicat. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. E50-59, 2006.
- BERTONI, G., and TREVISI., E. Use of the liver activity index and other metabolic variables in the assessment of metabolic health in dairy herds. **Vet Clin North Am Food Anim Pract** 29: 413-431, 2013.

BIONAZ, M.; HURLEY, W.; LOOR, J. Milk Protein Synthesis in the Lactating Mammary Gland: Insights from Transcriptomics Analyses. **Milk Protein: InTech**, 2012.

BIONAZ, M.; LOOR, J. J. Gene networks driving bovine milk fat synthesis.pdf. **BioMed Central**, v. 9, p. 366, 2008.

BRODERICK, G. A.; STEVENSON, M. J.; PATTON, R. A.; LOBOS, N. E.; COLMENERO, J. J. O. Effect of supplementing rumen-protected methionine on production and nitrogen excretion in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 91, n. 3, p. 1092–102, 2008.

BROSNAN, J. T., and BROSNAN, M. E. The sulfur-containing amino acids: An overview. **Journal of Nutrition**. 136(Suppl.):1636S–1640S, 2006.

CHEN, Z. H.; BRODERICK, G. A.; LUCHINI, N. D.; SLOAN, B. K.; DEVILLARD, E. Effect of feeding different sources of rumen-protected methionine on milk production and N-utilization in lactating dairy cows1. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 4, p. 1978–1988, 2011.

COLMENERO, J. J. O.; BRODERICK, G. A. Effect of Dietary Crude Protein Concentration on Milk Production and Nitrogen Utilization in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 5, p. 1704–1712, 2006.

DOEPEL, L.; LAPIERRE, H. Changes in production and mammary metabolism of dairy cows in response to essential and nonessential amino acid infusions. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 7, p. 3264–3274, 2010.

DRACKLEY, J. K. Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2259–2273, 1999.

EDMONSON, A. J.; LEAN, I. J.; WEAVER, L. D.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 68–78, 1989.

GALINDO, C.; LARSEN, M.; OUELLET, D. R.; MAXIN, G.; PELLERIN, D. Abomasal amino acid infusion in postpartum dairy cows: Effect on whole-body, splanchnic, and mammary glucose metabolism. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 11, p. 7962–7974, 2015.

GAO, H. N.; ZHAO, S. G.; ZHENG, N.; ZHANG, Y. D.; WANG, S. S.; ZHOU, X. Q.; WANG, J. Q. Combination of histidine, lysine, methionine, and leucine promotes β -casein synthesis via the mechanistic target of rapamycin signaling pathway in bovine mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 9, p. 7696–7709, 2017.

GIALLONGO, F.; HRISTOV, A. N.; OH, J.; FREDERICK, T.; WEEKS, H.; WERNER, J.; LAPIERRE, H.; PATTON, R. A. Effects of slow-release urea and rumen-protected methionine and histidine on performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**. p. 3292–3308, 2015.

GIALLONGO, F.; HARPER, M. T.; OH, J.; LOPES, J. C.; LAPIERRE, H.; PATTON, R. A.; PARYS, C.; SHINZATO, I.; HRISTOV, A. N. Effects of rumen-protected methionine, lysine, and histidine on lactation performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p. 4437–4452, 2016.

GIALLONGO, F.; HARPER, M. T.; OH, J.; PARYS, C.; SHINZATO, I.; HRISTOC, A. N. Histidine deficiency has a negative effect on lactational performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 2784–2800, 2017.

HAQUE, M. N.; RULQUIN, H.; ANDRADE, A.; FAVERDIN, P.; PEYRAUD, J. L.; LEMOSQUET, S. Changes in mammary metabolism in response to the provision of an ideal amino acid profile at 2 levels of metabolizable protein supply in dairy cows: Consequences on efficiency. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 6, p. 3951–3968, 2015.

HIGGS, R. J., Development of a dynamic rumen and gastro-intestinal model in the Cornell Net Carbohydrate and Protein System to predict the nutrient supply and requirements of dairy cattle. **PhD Thesis. Department of Animal Science. Cornell University**, 2014.

HRISTOV, A. N.; M. HANIGAN; A. COLE; R. TODD; T. A. MCALLISTER; P. M. NDEGWA; A. ROTZ. Ammonia emissions from dairy farms and beef feedlots: A review. **Can. Journal Animal Science**. 91:1–35, 2011.

HURLEY, W. L. Lactose Synthesis. **Lactation Biology**. Department of Animal Sciences, University of Illinois, Urbana – Champaign, 2012. <http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/lactosesynthesis.html>. Acessado em 15/03/2018.

JACOMETO, C. B.; ZHOU, Z.; LUCHINI, D.; TREVISI, E.; CORREA, M. N.; LOOR, J. J. Maternal rumen-protected methionine supplementation and its effect on blood and liver biomarkers of energy metabolism, inflammation, and oxidative stress in neonatal Holstein calves. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6753–6763, 2016.

JI, Y.; WUA, Z.; DAIA, Z.; SUNA, K.; WANGA, J.; WU, G. Nutritional epigenetics with a focus on amino acids: Implications for the development and treatment of metabolic syndrome. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 27, p. 1–8, 2016.

KOELEMAN, E. Methionine in cows diet for better embryos. **Dairy Global Magazine**. Disponível em: <http://dairyglobal.net/Articles/General/2016/6/Methionine-in-cows-diet-for-better-embryos-2819361W/>. 2016. Acessado em: 16/08/2017.

KOMARAGIRI, M. V; ERDMAN, R. A. Factors affecting body tissue mobilization in early lactation dairy cows. 1. Effect of dietary protein on mobilization of body fat and protein. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 5, p. 929–937, 1997.

KVIDERA, S. K.; HORST, E. A.; ABUAJAMIEH, M.; MAYORGA, J.; FERNANDEZ, M. V. S.; BAUMGARD, L. H. Glucose requirements of an activated immune system in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 2360–2374, 2017.

LAPIERRE, H., D. R. OUELLET, L. DOEPEL, G. HOLTROP, and G. E. LOBLEY. Histidine, lysine and methionine: From metabolism to balanced dairy rations. Pages 19–36 in **Proc. 44th Eastern Nutrition Conference of the Animal Nutrition Association of Canada (ANAC)**, University of Guelph, Guelph, ON, Canada. University of Guelph, Guelph, ON, Canada, 2008.

LARSEN, M.; KRISTENSEN, N. B. Precursors for liver gluconeogenesis in periparturient dairy cows. **Animal : an international journal of animal bioscience**, v. 7, n. 10, p. 1640–50, 2013.

LEAN, I. J.; ONDARZA, M. B.; SNIFFEN, C. J.; SANTOS, J. E. P.; GRISWOLD, K. E. Meta-analysis to predict the effects of metabolizable amino acids on dairy cattle performance. **Journal of Dairy Science**, p. 1–25, 2017.

LEE, C.; HRISTOV, A. N.; HEYLER, K. S.; CASSIDY, T. W.; LAPIERRE, H.; VARGA, G. A.; PARYSET, C. Effects of metabolizable protein supply and amino acid supplementation on nitrogen utilization, milk production, and ammonia emissions from manure in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 9, p. 5253–68, 2012a.

LEE, C.; HRISTOV, A. N.; CASSIDY, T. W.; HEYLER, K. S.; LAPIERRE, H.; VARGA, G. A.; de VETH, M. J.; PATTON, R. A. Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 10, p. 6042–6056, 2012b.

LEE, C.; GIALLONGO, F.; HRISTOV, A. N.; LAPIERRE, H.; CASSIDY, T. W.; HEYLER, K. S.; VARGA, G. A.; PARYSET, C. Effect of dietary protein level and rumen-protected amino acid supplementation on amino acid utilization for milk protein in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 3, p. 1885–1902, 2015.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Tradução de W. R. N. Lodi, e A. A. Simoes. São Paulo: Sarvier, Terceira Edição, Tradução de: Principles of biochemistry, 1999.

LEONARDI, C.; STEVENSON, M.; ARMENTANO, L. E. Effect of Two Levels of Crude Protein and Methionine Supplementation on Performance of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 12, p. 4033–4042, 2003.

LI, S.; HOSSEINI, A.; DANES, M.; JACOMETO, C.; LIU, J.; LOOR, J. J. Essential amino acid ratios and mTOR affect lipogenic gene networks and miRNA expression in bovine mammary epithelial cells. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 44, 2016.

MARTINOV, M. V.; VITVITSKY, V. M.; BANERJEE, R.; ATAULLAKHANOV, F. I. The logic of the hepatic methionine metabolic cycle. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 1, p. 89–96, 2010.

MAXIN, G.; OUELLET, D.; LAPIERRE, H. Contribution of amino acids to glucose and lactose synthesis in lactating dairy cows. **Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production**, v. 134, n. 134, p. 443–445, 2013.

NAN, X.; BU, D.; LI, J.; WANG, J.; WEI, H.; HU, H.; ZHOU, L.; LOOR, J. J. Ratio of lysine to methionine alters expression of genes involved in milk protein transcription and translation and mTOR phosphorylation in bovine mammary cells. **Physiological Genomics**, v. 46, n. 7, p. 268–275, 2014.

NORO, G. Síntese e secreção do leite. **Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal**, n. Vet 00036, p. 1–21, 2001.

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

NURSOY, H.; RONQUILLO, M. G.; FACIOLA, A. P.; BRODERICK, G. A. Lactation response to soybean meal and rumen-protected methionine supplementation of corn silage-based diets. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 3, p. 2084–2095, 2018.

ORDWAY, R. S.; BOUCHER, S. E.; WHITEHOUSE, N. L.; SCHWAB, C. G.; SLOAN, B. K. Effects of providing two forms of supplemental methionine to periparturient Holstein dairy cows on feed intake and lactational performance. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 5154–66, 2009.

OSORIO, J. S.; JI, P.; DRACKLEY, J. K.; LUCHINI, D.; LOOR, J. J. Supplemental Smartamine M or MetaSmart during the transition period benefits postpartal cow performance and blood neutrophil function. **Journal of Dairy Science** p. 6248–6263, 2013.

OSORIO, J. S.; TREVISI, E.; DRACKLEY, J. K.; LUCHINI, D.; BERTONI, G.; LOOR, J. J. Biomarkers of inflammation, metabolism, and oxidative stress in blood, liver, and milk reveal a better immunometabolic status in peripartal cows supplemented with Smartamine M or MetaSmart. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 12, p. 7437–7450, 2014.

PATTON, R. A. Effect of rumen-protected methionine on feed intake, milk production, true milk protein concentration, and true milk protein yield, and the factors that influence these effects: A meta-analysis. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 5, p. 2105–2118, 2010.

PEÑAGARICANO, F.; SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D.; DRIVER, A. M.; GAMBRA, R.; KROPP, J.; HACKBART, K. S.; LUCHINI, D.; SHAVER, R. D.; WILTBANK, M. C.; KHATIB, H. Effect of Maternal Methionine Supplementation on the Transcriptome of Bovine Preimplantation Embryos. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

PREYNAT, A.; LAPIERRE, H.; THIVIERGE, M. C.; PALIN, M. F.; MATTE, J. J.; DESROCHERS, A.; GIRARDET, C. L. Influence of methionine supply on the response of lactational performance of dairy cows to supplementary folic acid and vitamin B12. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 4, p. 1685–1695, 2009.

SANTOS, F. A. P.; SANTOS, J. E. P.; THEURER, C. B.; HUBER, J. T. Effects of Rumen-Undegradable Protein on Dairy Cow Performance: A 12-Year Literature Review. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 12, p. 3182–3213, 1998.

SANTOS, F.A.P. Metabolismo de proteínas. In: **Nutrição de Ruminantes**. 1. ed. Jaboticabal: Telma Teresinha Berchielli, Alexandre Vaz Pires e Simone Gisele de Oliveira, cap. 10, p. 255-284, 2006.

SCHINGOETHE, D. J.; KALSCHEUR, K. F.; HIPPEN, A. R.; GARCIA, A. D. Invited review : The use of distillers products in dairy cattle diets. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 12, p. 5802–5813, 2009.

SCHWAB, C. G.; BOZAK, C. K.; WHITEHOUSE, N. L. Amino Acid Limitation and Flow to the Duodenum at Four Stages of Lactation. 2. Extent of Lysine Limitation. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 12, p. 3503–3518, 1992.

SCHWAB, C. G., R. S. ORDWAY, N. L. WHITEHOUSE. Amino acid balancing in the context of MP and RUP requirements. Pag- es 10–25 in **Proc Four-State Applied Nutrition and Management Conference**, 2003.

SCHWAB, C. G.; BRODERICK, G. A. A 100-Year Review: Protein and amino acid nutrition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10094–10112, 2017.

SHIMADA, K., C. J. JONG, K. TAKAHASHI, and S. W. SCHAFFER. Role of ROS production and turnover in the antioxidant activity of taurine. **Adv. Exp. Med. Biol.** 803:581–596, 2015.

SOCHA, M. T.; PUTNAM, D. E.; GARTHWAITE, B. D.; WHITEHOUSE, N. L.; KIERSTEAD, N. A.; SCHWAB, C. G.; DUCHARME, G. A.; ROBERT, J. C. Improving Intestinal Amino Acid Supply of Pre- and Postpartum Dairy Cows with Rumen-Protected Methionine and Lysine,. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 3, p. 1113–1126, 2005.

SUN, F.; CAO, Y.; CAI, C.; LI, S.; YU, C.; YAOET, J. Regulation of nutritional metabolism in transition dairy cows: Energy homeostasis and health in response to post-ruminal choline and methionine. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–27, 2016.

TREVISI, E., M. AMADORI, S. COGROSSI, E. RAZZUOLI, and G. BERTONI. Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. **Res. Vet. Sci.** 93:695–704, 2012.

VAN-AMBURGH, M. E.; COLLAO-SAENZ, E. A.; HIGGS, R. J.; ROSS, D. A.; RECKTENWALD, E. B.; RAFFRENATO, E.; CHASE, L. E.; OVERTON, T. R.; MILLS, J. K.; FOSKOLOS, A. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System : Updates to the model and evaluation of version 6 . 5. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p. 6361–6380, 2015.

VERSCHUREN, L. M. G. L. The lactating sow. **The lactating sow.**, 1998.

WHITE, R. R.; ROMAN-GARCIA, Y.; FIRKINS, J. L.; KONONOFF, P.; VANDEHAAR, M. J.; TRAN, H.; MCGILL, T.; GARNET, R.; HANIGAN, N. D. Evaluation of the National Research Council (2001) dairy model and derivation of new prediction equations . **Journal of Dairy Science**, n. 2001, p. 1–17, 2017.

WILTBANK, M. C.; TOLEDO, M. Z.; BAEZ, G. M.; GARCIA-GUERRA, A.; LOBOS, N. E.; GUENTHER, J. N.; TREVISOLO, E.; LUCHINI, D.; SHAVER, R. D. Effect of feeding rumen-protected methionine on productive and reproductive performance of dairy cows. **PLoS ONE** 12(12): e0189117, 2017.

ZANTON, G. I. **Large Dairy Herd Management**. Third edit ed. [s.l.] American Dairy Science Association, 2017.

ZANTON, G. I.; BOWMAN, G. R.; RODE, L. M. Meta-analysis of lactation performance in dairy cows receiving supplemental dietary methionine sources or postruminal infusion of methionine. **Journal of Dairy Science** p. 7085–7101, 2014.

ZHANG, Q.; BERTICS, S. J.; LUCHINI, D.; WHITE, H. M. The effect of increasing concentrations of dl-methionine and 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid on hepatic genes controlling methionine regeneration and gluconeogenesis. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 10, p. 8451–8460, 2016.

ZHOU, Z.; VAILATI-RIBONI, M.; TREVISI, E.; DRACKLEY, J.K.; LUCHINI, D.; LOOR, J. J.. Better postpartal performance in dairy cows supplemented with rumen-protected methionine compared with choline during the peripartal period. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 11, p. 8716–8732, 2016a.

ZHOU, Z.; BULGARI, O.; VAILATI-RIBONI, M.; TREVISI, E.; BALLOU, M. A.; CARDOSO, F. C.; LUCHINI, D.; LOOR, J. J. Rumen-protected methionine compared with rumen-protected choline improves immunometabolic status in dairy cows during the peripartal period. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 11, p. 8956–8969, 2016b.

ZHOU, Z.; GARROW, T. A.; DONG, X.; LUCHINI, D.; LOOR, J. J. Hepatic Activity and Transcription of Synthase in Periparturient Dairy Cows Are Altered to Different Extents by Supply of. n. C, **Jornal of Nutrition**. p. 7–9, 2016c.

ZHOU, Z.; TREVISI, E.; LUCHINI, D.; LOOR, J. J. Differences in liver functionality indexes in peripartal dairy cows fed rumen-protected methionine or choline are associated with performance, oxidative stress status, and plasma amino acid profiles. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6720–6732, 2017.

ZOM, R. L. G.; VAN BAAL, J.; GOSELINK, R. M. A.; BAKKER, J. A.; DE VETH, M. J.; VAN VUUREN, A. M. Effect of rumen-protected choline on performance, blood metabolites, and hepatic triacylglycerols of periparturient dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 8, p. 4016–4027, 2011.

CAPÍTULO 2

Rumen protected methionine supplementation on performance of high production dairy cows

Valdir Chiogna Junior¹, Fernanda Lopes², Edgar Alain Collao-Saenz^{1*}

¹Department of Animal Science, Federal Univerity of Goias, Jataí, GO

²Adisseo Inc.

*Corresponding author

E-mail: edgar_collao_saenz@ufg.br

Abstract: Increasing methionine availability in dairy cow diets during early lactation may increase performance and lead to healthy benefits. The objective of this experiment was to determine the effect of supplementing rumen protected methionine (RPMet) on performance of lactating cows from the beginning to the first half of lactation. Seventy-six cows were blocked into two randomized groups by milk yield and days in milk. Supplemented RPMet was added to the treatment diet (SM) to achieve a LYS:MET ratio of 3:1 in metabolizable protein (MP). The duration of the experiment was 12 weeks, including 2 weeks of covariate and 10 weeks experimental period. Milk samples were collected every two weeks and analyzed for milk components. MET supplementation led to higher milk yield (41.7 vs. 40.1 kg/d; $P=0.02$), ECM (41 vs. 38 kg/d; $P<0.01$), milk protein percentage (3.14 vs. 2.17%; $P<0.01$), milk protein yield (1.30 vs. 1.19 kg/d; $P<0.01$), milk casein percentage (2.39 vs. 2.28%; $P<0.01$), milk fat yield (1.42 vs. 1.29 kg/d; $P=0.02$), total solids yield (5.01 vs. 4.75 kg/d; $P=0.05$) and showed a tendency for higher milk fat percentage (3.41 vs. 3.21%; $P=0.06$). The control group had greater milk lactose percentage (4.61 vs. 4.54%; $P=0.03$) and a tendency for greater BCS (3.4 vs. 3.3; $P=0.08$). There was no effect for DMI, milk lactose yield, total solids percentage, MUN and SCC. The RPMet supplementation effects suggests that common diets used in Brazil for high producing cows can be improved if balanced by amino acids, notably when LYS:MET ratio is adjusted according to NRC recommendation, being an option to upgrade dairy cow efficiency.

Key words: amino acids, milk protein, milk yield.

INTRODUCTION

Precision feeding is an useful strategy to improve income over feed cost in dairy production and using AA balanced diets can be an effective strategy to increase milk yield and components [1]. Dairy cow nutritionists are changing their focus from crude protein (CP) or even RDP and RUP to AA balance motivated by reducing feed costs, increasing milk production, improving protein efficiency and reducing environmental issues [2]. When rumen protected methionine (RPMet) was added to adjust a LYS:MET ratio to 3:1 as a percentage of MP [3], CP in the diets could be reduced by the usual 17% to 15% with no negative effects on milk yield and components. In addition, MUN and urine N excretion were reduced, improving N efficiency without altering apparent total-tract DM, and fiber digestibility.

Amino acids are the main factors contributing to milk protein synthesis, with MET and LYS being the most important EAA in the bovine mammary gland [4]. An effective approach to increasing post-ruminal MET supply is to feed RPMet. Previous studies found beneficial effects of RPMet on performance [5,6] and immunometabolic status [7,8,9] of dairy cows mainly during the transition period. When LYS is adequate, MET is typically first limiting AA and its supplementation alone improved overall lactation performance in dairy cows [10]. According to a study [6] supplementation of MET when LYS is adequate to achieve an approximately 2.9:1 LYS:MET (% of MP) ratio can improve milk yield, in part by increasing DMI and perhaps by optimizing the use of body lipid reserve.

A better leukocyte-killing capacity was observed when RPMet was supplemented on basal diets suggesting better immune function, and supporting the benefit of using adequate fine-tuning of EAA as percentage of MP requirement [6]. Regarding immunometabolic status around parturition, cows supplemented with RPMet have higher liver functionality index (LFI). The LFI represents an assessment of transition cow metabolic health by measuring changes in biomarkers associated with liver plasma protein synthesis (albumin), lipoprotein synthesis (cholesterol), and heme catabolism (bilirubin) [11].

Methionine is the only AA which contain sulfur acting as the precursor for other sulfur-containing AA such cysteine, homocysteine and taurine. These amino acids play crucial roles in metabolism mainly in methylation reactions. Metabolism of methionine begins with its activation to S-adenosylmethionine (SAM), which is a key cofactor of

the MET metabolism intermediate used in methylation reactions, and can donate its methyl group to a wide variety of receptors, such as amino acid residues in proteins, DNA, RNA and small molecules [12]. Methyl-protected donors supplementation such as methionine protected from rumen degradation (RPMet) may help to meet the requirements of lactating cows during the transition period [6,7] when cows have high outputs of methylated compound in milk and the sources of methyl group are in short supply [9]. The effects of the amount and AA balance, mainly MET, on transition cows go beyond production and health benefits [2].

Nowadays the field nutritionists are trying to meet not only MP requirements but also the amino acids content in the diet. However, to date, we have few studies in the tropics regarding amino acid balancing throughout lactation, especially around the peak and its impact on the lactation curve. The most research studies focus on transition period or very early lactation. In this trial we tried to meet at least the three most important amino acids requirements in dairy production (lysine, methionine and histidine) using an RPMet source which is the deficient amino acid in traditional diets. The objective of this experiment was to discuss the effect of supplementing RPMet on performance of lactating cows from the beginning to the first half of lactation.

MATERIALS AND METHODS

Animal Housing and Care

All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and use Committee (CEUA) of the Federal University of Goiás - Jataí, protocol number 024/17. Cows were housed on a free stall system, equipped with sand beds and cooling system (sprinklers and fans), to provide good animal welfare conditions. The cows had free access to drinking water and a TMR diet was offered twice daily (6:00 am/ 3:00 pm) and adjusted daily to ensure 5% refusals. Cows were milked 3 times daily (05:30 am/ 12:00 pm/ 8:00 pm).

Experimental Design and Treatment Diets

Seventy-six multiparous Holstein lactating cows from a commercial farm were used in a randomized complete block design study with 38 blocks. Cows were blocked by milk yield (39.1 ± 6.8 SD kg) and DIM (days in milk; 65 ± 28 SD), and allocated within each block to one of 2 experimental diets (Table 1). At the beginning of the study, the cows were with 2.75 ± 1 lactations, 645.4 ± 45.6 of BW, and 3.3 ± 0.3 of BCS. The

duration of the experiment was 12 weeks, including the first 2 wk for covariate and diet adaptation and 10 wk of experimental period.

The two experimental diets had similar nutrient composition differing only in the methionine level and formulated using NRC model [13] to meet the nutrients requirements for lactating cows, using group average milk yield, BW, milk composition (3.6% fat and 3.07% true protein). The basal diet (kg DM) composition was 12.06 kg corn silage, 1.16 kg fresh grass, 4.01 kg soybean meal, 0.33 kg soybean meal treated, 4.55 kg high moisture corn, 2.73 kg soybean hulls, 0.06 kg urea, 0.48 kg protected saturated fatty acids, 0.844 kg mineral/vitamin premix. Control diet were a basal diet (CON) and the treatment diet (SM) were the basal diet plus 23 grams of SMARTAMINE M® - SM (Adisseo Inc., Antony, France), which provide 14 grams of metabolizable MET. The SMARTAMINE M® contains 75% DL-methionine, physically protected by a pH sensitive coating, which is considered to have 80% of MET bioavailability [14]. The RPMet was pre-mixed with some ingredients (mineral/vitamin, urea, soybean meal treated, saturated fat), and then mixed at the TMR. The control diet had the same procedure, but with no SMARTAMINE M® (Table 1).

Table 1. Nutrient composition (%) of dietary Control and Methionine supplemented (NRC, 2001)

Item	Diet (%)	
	CON	SM
Corn silage ¹	45.81	45.81
Fresh grass (Tifton) ²	4.41	4.41
Soybean meal, solv. ³ 46% CP	15.57	15.57
Soybean meal treated ⁴	1.25	1.25
Smartamine® ⁵	-	0.09
High moisture corn ⁶	17.28	17.28
Soybean hulls	10.36	10.36
Saturated fat supplemented ⁷	1.81	1.81
Urea	0.23	0.23
Mineral/vitamin premix ⁸	3.20	3.11
<i>Diet chemical composition, % of DM⁹</i>		
Crude Protein (CP)	16.7	16.7
RDP	10.3	10.3
RUP	6.4	6.4
NDF	30.8	30.8
Forage NDF	20.8	20.8
ADF	19	19
NFC	42.3	42.3
Starch	27.7	27.7
Ether-Extract	4.6	4.6
NEI (Mcal/kg)	1.6	1.6
Ca	1	1
P	0.4	0.4
<i>Diet Protein Balance⁹</i>		
RDP required, g/d	2595	2597
RDP supplied, g/d	2711	2715
RDP balance, g/d	116	118
RUP required, g/d	1539	1537
RUP supplied, g/d	1672	1688
MP balance, g/d	113	129
Lys:Met	3.77:1	2.97:1

CON = Control diet; SM = Methionine Supplemented diet (% of DM)

¹ Corn silage = 33.5% DM, 7.98% CP, 33.3% Starch, 39.5% NDF

² Fresh grass = 28.8% DM, 14.9% CP, 60.7% NDF

³ Soybean meal = Soybean meal 46% CP Cargill® Inc.

⁴ Soybean meal, treated = Soypass® BR Cargill® Inc.

⁵ Smartamine M® SM = rumen protected methionine, Adisseo Inc., Antony, France

⁶ High moisture corn = 64.8% DM, 8.8% CP, 69% Starch

⁷ Saturated fat supplemented = Enerfat®, Kemin® Industries Inc., USA

⁸ Mineral/vitamin premix = Precisão Nata® (Campo® Rações e Minerais); Mg 35 g/kg, Na 85 g/kg, Cl 80 g/kg, Ca 190 g/kg, P 24 g/kg, S 4.000 mg/kg, K 9.900 mg/kg, Cu 450 mg/kg, Zn 2.300 mg/kg, Fe 2.000 mg/kg, Mn 1.800 mg/kg, I 25 mg/kg, Co 30 mg/kg, Se 15 mg/kg, F 300 mg/kg, VitA 156.000UI/kg, VitD 51.500UI/kg, VitE 1.000UI/kg, Biotin 35 mg/kg, Cr 20 mg/kg, Monensin 510 mg/kg, *Saccharomyces cerevisiae* 1.40x10⁵ UFC/kg.

⁹ Values estimated based on NRC (2001) with chemical analyzes of the feeds.

Sampling and measurements

The TMR fed and refusals were recorded daily during the experiment to measure group feed intake. TMR samples were collected twice a week to measure dry matter percentage. The forages were analyzed every fifteen days to adjust the diet. Diets DMI were recorded daily by group. Composited feed ingredient samples were analyzed by wet chemistry by a commercial lab for CP, NDF, ADF, starch, EE, ash, Ca, P by AOAC. AA composition was analyzed by CEAN Lab – Adisseo Brazil. Composited milk samples were collected in a covariate period and each two weeks until the end of the study. Samples were preserved with 2-bromo-2nitropropane-1,3-diol, and sent to Clínica do Leite (USP lab in Piracicaba-SP) and analyzed for solids content, MUN and SCC by infra-red/ISO (9622:2013/IDF 141:2013).

Milk yield were individually recorded daily by a GEA® milking system, and data were sent to a software program (DairyPlan®). Energy-corrected milk (ECM) was calculated according formula $ECM = [(0.323 \times \text{kg of milk}) + (12.82 \times \text{kg of fat}) + (7.13 \times \text{kg of true protein})]$ [15]. During the covariate period and at the end of the period, cows were individually weighted after the second milking of the day. Body condition score was evaluated at the same date and time, by one trained person using a 5-point scale [16].

Statistical Analysis

Data were analyzed as a randomized complete-block design with a covariate using the MIXED procedure of SAS (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC). The model included covariate, block, treatment, week, and the relevant interactions as fixed effects, and cow in block as a random effect. Week of treatment was included as a repeated measure using the autoregressive order one-covariance structure to account for autocorrelated errors. Means were determined using the least squares means statement, and treatment means were compared using the Bonferroni t-test option after a significant ($P < 0.05$) overall treatment F-test. Interaction effects were partitioned using the SLICE options of SAS (version 9.4, SAS Institute Inc.). Statistical significance and trends were considered at $P \leq 0.05$ and $P > 0.05$ to $P \leq 0.10$., respectively.

A complementary analysis was performed separating cows with less than 70 days in milk (20 blocks) and with more than 70 days (18 blocks).

RESULTS AND DISCUSSION

Diets were balanced to ensure an adequate quantity of the first three limiting AA for dairy cows: 180 grams of LYS, 60 grams of MET (treatment diet), and 60 grams of HIS. The amino acids balance and supply (Table 2) were calculated as the sum of the Duodenal Amino Acid Supply from NRC (2001).

Table 2. Essential amino acids supply to duodenal based on experimental diets estimated from NRC (2001)

Amino acid	Diet					
	CON			SM		
	Flow (g/d)	DIGAA Flow (g/d)	% of MP	Flow (g/d)	DIGAA Flow (g/d)	% of MP
Arginine	169	141	4.79%	169	142	4.77%
Histidine	75	62	2.12%	75	62	2.10%
Isoleucine	173	142	4.81%	173	142	4.79%
Leucine	312	256	8.67%	312	256	8.62%
Lysine	228	188	6.37%	229	189	6.35%
Methionine	61	50	1.69%	75	64	2.14%
Phenylalanine	179	147	4.98%	179	148	4.97%
Threonine	171	140	4.73%	171	140	4.71%
Valine	194	158	5.37%	194	159	5.35%
Totals	1562	1286	43.53%	1578	1301	43.8%

CON = Control diet; SM = Methionine Supplemented diet

NRC recommendations [13] suggest that the required amounts of LYS and MET in MP for optimal milk protein production are 7.2 and 2.4%, respectively. Because these amounts are difficult to achieve, without feeding very high levels of protein, it is recommended that the first step in balancing diets for LYS and MET is to maintain the ration between them in MP of 3:1 and to try to achieve more practical levels as close to 6.6 and 2.2% [17].

According to NRC [13], the concentration of MET and HIS in milk protein is similar (5.5% of EAA). The same amount of MET and HIS (around 2.2% of MP) was suggested [18,19] based on the similar metabolism of this AA across the splanchnic and mammary gland tissue.

Studies peer-reviewed [20] to update a CNCPS model suggested, when using this model, a ratio LYS:MET of 2.7:1 (7.00 and 2.60% of MP) and 2.4:1 (6.77 and 2.85% of MP) to maximize milk protein yield and milk protein content respectively. The

LYS:MET ratio in SM diet when analyzed by this model, was 2.68:1. Typically, recommendations for AA balancing are made relative to total MP supply, but previous data suggests be more appropriate to consider AA supply relative to metabolizable energy (ME) to improve productivity and efficiency of nutrient utilization. This approach suggests as the optimum relationship between AA and energy of 1.14 and 3.03 g of AA/ Mcal of ME for MET and LYS respectively [21]. On the SM diet the ratio was 1.14 g/ Mcal for MET and 3.04 g/ Mcal for LYS.

In our trial the DMI was not affected by treatment (26.2 kg/d vs. 26.1 kg/d). The effects on DMI in previous studies using RPMet supplementation had shown inconsistent responses. Some studies had no effect on DMI [5,22,23,24,25] but in other studies was reported significant DMI increase [6,26,27,28].

The higher DMI observed in RPMet diets can be partly explained by a reduction in inflammation and oxidative stress levels, leading a better immunometabolic status and better liver function [7,9]. These authors suggested in addition that high MET availability enhance substrate for glutathione synthesis, the most abundant natural antioxidant, inducing a positive immunomodulatory effect in dairy cows particularly during periods of stress such as the transition period.

In addition to the greater consumption, which alleviated the negative energy balance, there was a better modulation of hepatic lipid metabolism, improving health and performance of cows [26]. In another study [28] the higher DMI of the cows, and consequent higher energy consumption, did not reduce the negative energy balance in relation to the control group, but this fact was expected due to the increase in milk production and protein in cows milk supplemented with RPM.

According to a meta-analysis data [29] from 35 studies, some factors like differences in level of MET supplementation, presence of co-limiting AA, length of feeding, and stage of lactation can influence intake and confound the results. Another study [6] agree with this assumption and adds a possible carryover effect of supplemental MET during the close-up period as another factor on DMI response. In a meta-analyses [30] from 64 papers, sources of RPMet may had influenced changes in DMI.

In this trial, milk yield, ECM, FCM, milk protein percentage, milk protein yield, milk casein percentage, milk fat yield and total solids yield were affected by the SM diet. A tendency for higher milk fat percentage was also observed in that group. The control group had higher milk lactose percentage and a tendency for greater BCS (3.4 vs. 3.3;

$P=0.08$) compared with the SM group, but no effect in BW (656.5 vs. 648.5 kg; $P=0.12$) was observed. There was no effect for milk lactose yield, total solids percentage, MUN and SCC between groups. All the results are summarized on Table 3.

Table 3. Effects of dietary MET supply on milk yield and composition in dairy cows.

Item	Diet		SEM	P-value		
	CON	SM		Diet	week	Diet x week
Milk yield, kg/d	40.11	41.66	0.50	0.03	0.19	0.87
ECM ¹ , kg/d	37.97	40.96	0.67	<0.01	0.07	0.99
FCM ² 3.5%	38.28	41.06	0.77	0.01	0.14	0.97
Milk fat, %	3.21	3.41	0.07	0.06	0.85	0.99
Milk fat, kg/d	1.29	1.42	0.04	0.02	0.64	0.99
Milk protein, %	2.97	3.14	0.03	<0.01	<0.01	0.95
Milk protein, kg/d	1.19	1.30	0.01	<0.01	<0.01	0.95
Milk casein, %	2.28	2.39	0.03	<0.01	<0.01	0.96
Milk lactose, %	4.61	4.54	0.02	0.03	<0.01	0.83
Milk lactose, kg/d	1.85	1.89	0.03	0.26	0.02	0.80
Total solids, %	11.78	12.10	0.13	0.10	0.42	0.96
Total solids, kg/d	4.75	5.01	0.09	0.05	0.20	0.96
MUN, mg/dL	10.43	10.74	0.24	0.37	<0.01	<0.01
SCC, X10 ³	135.86	180.50	44.70	0.48	0.13	0.37

CON = Control diet; SM = Methionine Supplemented diet at 2.14% of MP

¹Energy-corrected milk (kg/d) = [(0.323 x kg of milk) + (12.82 x kg of fat) + (7.13 x kg of true protein)] (Hutjens, 2010).

²Fat corrected milk (3.5%) = 0.4318 kg milk + 16.23 kg milk fat

Milk Yield

Higher milk yield ($P=0.03$), FCM ($P=0.01$) and ECM ($P<0.01$) were observed in SM treatment. The mechanisms by which RPMet supplementation increases milk production are not fully understood, but considering some mechanisms proposed in different RPMet studies, where methionine supplementation improved the lactation performance, the response in this experiment would be due the higher efficiency in amino acids use, better health and liver function, and reduction in energy demand and nutrients to the immune system.

The response between groups over the weeks can be observed on Fig 1, which shows the lactating curve in each group.

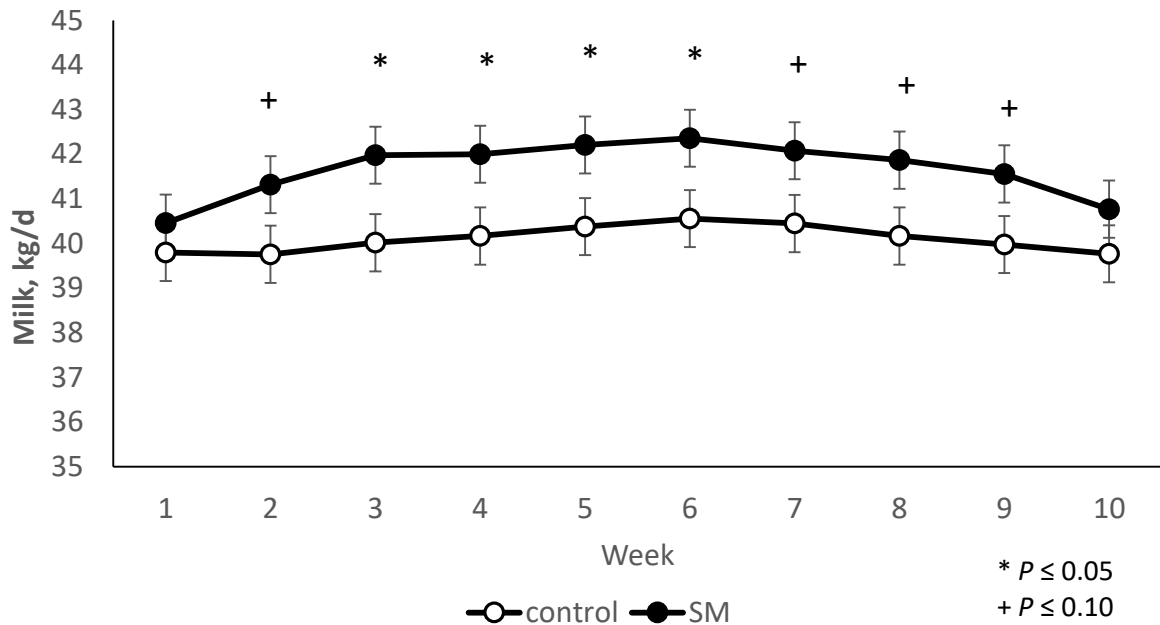


Fig 1. Effect of RPMet supplementation on milk yield compared with control group. Values are expressed in milk average production (kg/d) by groups during the trial.

Increase in milk yield response was previously observed in data from trials which state that RPMet consistently improved milk yield in transition cows [6,26,27]. Previous study [6] attributed the higher milk yield in part due to the higher dry matter intake and the optimization of mobilized body reserve lipids. Nevertheless, other studies did not detect increases in milk production [22,23]. Different results in previous studies suggested that the response in milk yield when methionine was supplemented could vary depending on several factors such as MET supply and MET source, level of lysine [31], MP and RDP in the diets and lactation stage [32].

A suitable profile and amount of essential amino acids (EEA) is crucial not only for success in the transition period, but also during peak production with consequent optimization of lactation [28]. According to the authors the greater milk production was at least in part driven by greater DMI and better liver function.

Supplementation of lactating cows with MET also increased ECM yield, and milk protein yield [5]. This better performance is likely due, in part, to a better immune and feed intake response [27].

Although MET may serve as a glycogenic amino acid, and as much of the glucose required to produce lactose (the first determinant of milk volume) in the mammary gland is derived from gluconeogenesis [33], this AA is not prioritized for glucose production, and the quantitative contribution of essential amino acids to glycogenic carbon is too small [34]. Cows have other metabolic priorities of fundamental biological processes such as protein synthesis, DNA methylation, SAM dependent trans-methylation reactions, polyamine formation, glutathione synthesis, phosphatidylcholine and the non-essential amino acid cysteine [35]. It is assumed that the biological priority for these purposes exceeds the use of MET for hepatic gluconeogenesis [36].

A study observed that the mammary gland (MG) responded positively in milk and milk protein yields to EAA supplementation, even no increase in glucose uptake, demonstrating the metabolic priority of milk production and the flexibility of the MG to use various substrates (beta-hydroxybutyrate acid and lactate) when there are EEA supply [37].

Cows supplemented with RPMet have showed an improvement in metabolic status, which has been associated with an increase in net energy efficiency due in part to a decrease in energy demands by the immune system, which activated leads to an increase in glucose use. The inflammatory status in early lactation cows can decrease milk synthesis as a strategy to spare glucose to the immune system [38].

When milk yield was analysed by DIM (<70 and >70d) we can observe (Table 4) a tendency to higher response during the early lactation (<70d).

Table 4. Effect of RPMet supplementation on milk yield by DIM (<70 and >70d).

	Diet		SEM	P-value		
	CONT	SM		Diet	Week	Diet x Week
Milk <70 DEL, kg/d	41.56	43.36	0.69	0.08	<0.001	0.94
Milk >70 DEL, kg/d	38.51	39.78	0.67	0.16	<0.001	0.98

Milk Components

Independently of the week RPMet increased milk protein percentage ($P<0.01$), milk protein yield ($P<0.01$) and milk casein percentage ($P<0.01$). Casein (%) and protein (%) were also affected by the week but no interaction between week and treatment was observed. Protein synthesis is sensitive to MET and rapamycin (mTOR)

signaling and may explain why lactating dairy cows fed corn-based diets, normally have higher protein production with RPMet supplementation. Methionine may exert an effect on the rate of FSR (rate of protein phosphorylation signaling), which is not mediated by mTOR [39].

The MET:LYS ratio has a significant influence on the expression of casein in bovine mammary epithelial cells, and the peak of concentration of casein at a supplemental 3:1 ratio between lysine and methionine is driven in part via upregulation of the mRNA expression and mTOR pathways [4]. This mechanism may explain the higher milk casein percentage observed in this study. Several studies in which RPMet was supplemented resulted in increases in the milk protein percentage [6,22,26,27]. The magnitude of the increase occurs in direct proportion to the adequacy of MET in the metabolizable protein [13].

Amino acids do not only serve as direct precursors of protein synthesis, but also act as regulators of the rate of this synthesis. The amount of the essential amino acids (EAA) in the diet is important for milk protein synthesis, but the correct balance of EAA in the diet is more important to improve milk protein yield [40,41].

An increase in fat yield ($P=0.02$), and a tendency to increase fat percentage ($P=0.06$) was also observed on SM treatment (Figure 4). The increase in milk fat yield was due the increase in milk production. Similar results was founded in previous studies [6,26,27].

The effect of MET supplementation on regulation of milk fat synthesis has to be further investigated, however some mechanisms have been proposed to explain how this amino acid can increase milk fat. Regarding to milk fat, methionine is considered a lipotropic agent. Possibly the most important role of MET in the liver is stimulating the synthesis of very low-density lipoprotein (VLDL). Methionine, as a methyl-donor, improve the synthesis of the methylated compound S-adenosylmethionine (SAM) [42]. In its turn SAM can be used to produce phosphatidylcholine, which is a main constituent of the membrane that covers VLDL, facilitating its formation and export of the liver [43] consequently helping to minimize the accumulation of triacylglycerol (TAG) on liver. The fatty acids of 18 carbons and some of 16 carbons represent up 40 to 60% of the milk fat and come almost entirely from VLDL. In the mammary gland, VLDL is anchored to the endothelium by lipoprotein lipase (LPL), which then hydrolyzes TAG in the lipoprotein nucleus to release fatty acid [44].

The accumulation of TAG on liver inducing to liver steatosis, can suppress feed intake in the transition period by an increase of the hepatic oxidation according to the Hepatic Oxidation Theory (HOT) theory [45,46]. Oxidative stress status also could be influenced by MET availability because it could serve as a substrate for glutathione synthesis via homocysteine produced in the MET cycle [42]. Glutathione is one of the most abundant natural antioxidants produced within the liver, and a reduction in its synthesis in rodents promoted steatosis, mitochondrial damage, and marked increases in lipid peroxidation [47]. Another effect of MET on milk fat was in a study [48] an up-regulation of lipogenic gene networks and the changes in expression of key miRNA involved in the control of lipogenic balance that can indicate a potential important role of EAA ratios and mTOR signaling in the regulation of milk fat synthesis.

The control group showed higher great milk lactose percentage ($P=0.03$) but not effect on milk lactose yield (Fig 4) suggesting dilution of this component in the higher milk volume in SM treatment. The high total solids yield ($P=0.05$) on SM treatment, but not in percentage, may have been influenced by the lower lactose percentage.

CONCLUSION

Results confirm the effect of RPMet supplementation on milk composition and milk yield, suggesting that the efficiency of nutrient utilization of diets with adequate level of LYS and HIS can be improved by adjusting the MET level.

Overall, the results of this trial underscore the benefits of amino acids balance, mainly methionine, in lactating dairy diets to improve their efficiency in the first third of lactation.

REFERENCES

1. Zanton GI. Large Dairy Herd Management. 2017. Third edit. Beede D.K., editor. American Dairy Science Association; 2017. 625-637. <https://www.adsa.org/>
2. Schwab CG, Broderick GA. A 100-Year Review: Protein and amino acid nutrition in dairy cows. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2017; 100(12):10094–112. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13320>
3. Nursoy H, Ronquillo MG, Faciola AP, Broderick GA. Lactation response to soybean meal and rumen-protected methionine supplementation of corn silage-based diets. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2018;101(3):2084–95. <https://doi: 10.3168/jds.2017-13227>
4. Nan X, Bu D, Li X, Wang J, Wei H, Hu H, et al. Ratio of lysine to methionine alters expression of genes involved in milk protein transcription and translation and mTOR phosphorylation in bovine mammary cells. Physiol Genomics; 2014; 46(7):268–75. <https://doi: 10.1152/physiolgenomics.00119>
5. Chen ZH, Broderick GA, Luchini ND, Sloan BK, Devillard E. Effect of feeding different sources of rumen-protected methionine on milk production and N-utilization in lactating dairy cows¹. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2011;94(4):1978–88. <https://doi: 10.3168/jds.2010-3578>
6. Osorio JS, Ji P, Drackley JK, Luchini D, Loor JJ. Supplemental Smartamine M or MetaSmart during the transition period benefits postpartal cow performance and blood neutrophil function. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2013;6248–63. <https://doi: 10.3168/jds.2012-5790>
7. Osorio JS, Trevisi E, Ji P, Drackley JK, Luchini D, Bertoni G, et al. Biomarkers of inflammation, metabolism, and oxidative stress in blood, liver, and milk reveal a better immunometabolic status in peripartal cows supplemented with Smartamine M or MetaSmart. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2014;97(12):7437–50. <https://doi: 10.3168/jds.2013-7679>
8. Jacometo CB, Zhou Z, Luchini D, Trevisi E, Corrêa MN, Loor JJ. Maternal rumen-protected methionine supplementation and its effect on blood and liver biomarkers of energy metabolism, inflammation, and oxidative stress in neonatal Holstein calves. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2016;99(8):6753–63. <https://doi: 10.3168/jds.2016-11018>
9. Zhou Z, Vailati-Riboni M, Trevisi E, Drackley JK, Luchini DN, Loor JJ. Better postpartal performance in dairy cows supplemented with rumen-protected methionine compared with choline during the peripartal period. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2016;99(11):8716–32. <https://doi: 10.3168/jds.2015-10525>

10. Armentano LE, Bertics SJ, Ducharme GA. Response of Lactating Cows to Methionine or Methionine Plus Lysine Added to High Protein Diets Based on Alfalfa and Heated Soybeans. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 1997;80(6):1194–9. [https://doi:10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76047-8](https://doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)76047-8)
11. Zhou Z, Trevisi E, Luchini DN, Looor JJ. Differences in liver functionality indexes in periparturient dairy cows fed rumen-protected methionine or choline are associated with performance, oxidative stress status, and plasma amino acid profiles. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2017;100(8):6720–32. [https://doi: 10.3168/jds.2016-12299](https://doi:10.3168/jds.2016-12299)
12. Brosnan JT, Brosnan ME. The sulfur-containing amino acids: An overview. Journal of Nutrition. 2006; 136(Suppl.):1636S–1640S. [https://doi: 10.1093/jn/136.6.1636S](https://doi:10.1093/jn/136.6.1636S)
13. NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition. Seventh Revised ed. Washington DC, USA: National Research Council National Academy Press; 2001.
14. Schwab CG. Protected proteins and amino acids for ruminants. Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding. 2007; pages 115-141. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany. [https://doi: org/10.1002/9783527615353.ch7](https://doi.org/10.1002/9783527615353.ch7)
15. Hutjens MF. Benchmarking your feed efficiency, feed costs, and income over feed cost. Proc. Western Canadian Dairy Seminar. 2010. Red Deer, Alberta, Canada. University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.
16. Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 1989;72(1):68–78. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79081-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79081-0)
17. Schwab CG, Ordway RS, Whitehouse, NL. Amino acid balancing in the context of MP and RUP requirements. 2003; Proc Four-State Applied Nutrition and management Conference. Pages 10-25.
18. Lapierre H, Ouellet DR, Doepel L, Holtrop G, Lobley GE. Histidine, lysine and methionine: From metabolism to balanced dairy rations. Proc. 44th eastern Nutrition Conference of Animal Nutrition association of Canada (ANAC) 2008. University of Guelph, Guelph, ON, Canada.
19. Lee C, Hristov AN, Cassidy TW, Heyler KS, Lapierre H, Varga GA, et al. Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2012;95(10):6042–56. [https://doi: 10.3168/jds.2012-5581](https://doi:10.3168/jds.2012-5581)

20. Amburgh ME Van, Higgs RJ, Ross DA, Recktenwald EB, Raffrenato E. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System : Updates to the model and evaluation of version 6 . 5. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2015;98(9):6361–80. <https://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9378>
21. Higgs, RJ. Development of a dinamic rumen and gastro-intestinal model in tha Cornell Net Carbohydrate and Protein System to predict the nutrient supply and requirements of dairy cattle. PhD Thesis. Department of Animal Science. 2014. Cornell University, NY.
22. Ordway RS, Boucher SE, Whitehouse NL, Schwab CG, Sloan BK. Effects of providing two forms of supplemental methionine to periparturient Holstein dairy cows on feed intake and lactational performance. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2009;92(10):5154–66. <https://doi:10.3168/jds.2009-2259>
23. Preynat A, Lapierre H, Thivierge MC, Palin MF, Matte JJ, Desrochers A, et al. Influence of methionine supply on the response of lactational performance of dairy cows to supplementary folic acid and vitamin B12. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2009;92(4):1685–95. <https://doi:10.3168/jds.2009-2796>
24. Lee C, Giallongo F, Hristov AN, Lapierre H, Cassidy TW, Heyler KS, et al. Effect of dietary protein level and rumen-protected amino acid supplementation on amino acid utilization for milk protein in lactating dairy cows. J Dairy Sci [Internet]. Elsevier; 2015;98(3):1885–902. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8496>
25. Giallongo F, Harper MT, Oh J, Lopes JC, Lapierre H, Patton RA, et al. Effects of rumen-protected methionine, lysine, and histidine on lactation performance of dairy cows. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2016;99(6):4437–52. <https://doi:10.3168/jds.2017-14130>
26. Sun F, Cao Y, Cai C, Li S, Yu C, Yao J. Regulation of nutritional metabolism in transition dairy cows: Energy homeostasis and health in response to post-ruminal choline and methionine. PLoS One. 2016;11(8):1–27. <https://doi:10.1371/journal.pone.0160659>
27. Zhou Z, Bulgari O, Vailati-Riboni M, Trevisi E, Ballou MA, Cardoso FC, et al. Rumen-protected methionine compared with rumen-protected choline improves immunometabolic status in dairy cows during the peripartal period. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2016;99(11):8956–69. <https://doi:10.1186/s40104-018-0230-8>
28. Batistel F, Arroyo JM, Bellingeri A, Wang L, Saremi B, Parys C, et al. Ethyl-cellulose rumen-protected methionine enhances performance during the periparturient period and early lactation in Holstein dairy cows. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2017;1–13. <https://doi:10.3168/jds.2017-12689>

29. Patton R a. Effect of rumen-protected methionine on feed intake, milk production, true milk protein concentration, and true milk protein yield, and the factors that influence these effects: A meta-analysis. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2010;93(5):2105–18. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2693>
30. Zanton GI, Bowman GR, Rode LM. Meta-analysis of lactation performance in dairy cows receiving supplemental dietary methionine sources or postruminal infusion of methionine. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2014;7085–101. <https://doi: 10.3168/jds.2014-8220>
31. Socha MT, Putnam DE, Garthwaite BD, Whitehouse NL, Kierstead NA, Schwab CG, et al. Improving Intestinal Amino Acid Supply of Pre- and Postpartum Dairy Cows with Rumen-Protected Methionine and Lysine,. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2005;88(3):1113–26. [https://doi: 10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72778-8](https://doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72778-8)
32. Schwab CG, Bozak CK, Whitehouse NL, Olson VM. Amino Acid Limitation and Flow to the Duodenum at Four Stages of Lactation. 2. Extent of Lysine Limitation. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 1992;75(12):3503–18. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78125-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78125-9)
33. Aschenbach JR, Kristensen NB, Donkin SS, Hammon HM, Penner GB. Gluconeogenesis in dairy cows: The secret of making sweet milk from sour dough. IUBMB Life. 2010;62(12):869–77. <https://doi: 10.1002/iub.400>
34. Larsen M, Kristensen NB. Precursors for liver gluconeogenesis in periparturient dairy cows. Animal; 2013;7(10):1640–50. <https://doi: 10.1017/S1751731113001171>
35. Galindo C, Larsen M, Ouellet DR, Maxin G, Pellerin D, Lapierre H. Abomasal amino acid infusion in postpartum dairy cows: Effect on whole-body, splanchnic, and mammary glucose metabolism. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2015;98(11):7962–74. <https://doi: 10.3168/jds.2014-9013>
36. Zhang Q, Bertics SJ, Luchini ND, White HM. The effect of increasing concentrations of DL-methionine and 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid on hepatic genes controlling methionine regeneration and gluconeogenesis. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2016;99(10):8451–60. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11312>
37. Doepel L, Lapierre H. Changes in production and mammary metabolism of dairy cows in response to essential and nonessential amino acid infusions. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2010;93(7):3264–74. <https://doi: 10.3168/jds.2009-3033>
38. Kvidera SK, Horst EA, Abuajamieh M, Mayorga EJ, Fernandez MVS, Baumgard LH. Glucose requirements of an activated immune system in lactating Holstein cows. J Dairy Sci. American Dairy Science Association; 2017;100(3):2360–74. <https://doi: 10.3168/jds.2016-12001>

39. Appuhamy JADRN, Knoebel NA, Nayananjalie WAD, Escobar J, Hanigan MD. Isoleucine and Leucine Independently Regulate mTOR Signaling and Protein Synthesis in MAC-T Cells and Bovine Mammary Tissue Slices. *J Nutri.*; 2012;(9). [https://doi: 10.3945/jn.111.152595](https://doi:10.3945/jn.111.152595)
40. Haque MN, Guinard-Flament J, Lamberton P, Mustière C, Lemosquet S. Changes in mammary metabolism in response to the provision of an ideal amino acid profile at 2 levels of metabolizable protein supply in dairy cows: Consequences on efficiency. *J Dairy Sci. American Dairy Science Association*; 2015;98(6):3951–68. <https://doi:10.3168/jds.2014-8656>
41. Gao HN, Zhao SG, Zheng N, Zhang YD, Wang SS, Zhou XQ, et al. Combination of histidine, lysine, methionine, and leucine promotes β -casein synthesis via the mechanistic target of rapamycin signaling pathway in bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci. American Dairy Science Association*; 2017;100(9):7696–709. <https://doi:10.3168/jds.2015-10729>
42. Martinov M V., Vitvitsky VM, Banerjee R, Ataullakhanov FI. The logic of the hepatic methionine metabolic cycle. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2010;1804(1):89–96. <https://doi:10.1016/j.bbapap.2009.10.004>
43. Zom RLG, van Baal J, Goselink RMA, Bakker JA, de Veth MJ, van Vuuren AM. Effect of rumen-protected choline on performance, blood metabolites, and hepatic triacylglycerols of periparturient dairy cattle. *J Dairy Sci. American Dairy Science Association*; 2011;94(8):4016–27. <https://doi:10.3168/jds.2011-4233>
44. Bionaz M, Loor JJ. Gene networks driving bovine milk fat synthesis.pdf. *BioMed Cent*. 2008;9:366. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-366>
45. Allen MS, Bradford BJ, Havartine KJ. The cow as a model to study food intake regulation. *Ann. Rev. Nutr.* 2005; 25:523-547. <https://doi:10.1146/annurev.nutr.25.050304.092704>
46. Allen MS, Bradford BJ. From the liver to the brain: increasing feed intake in transition cows. *Proc. 68th Meeting of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, Department of Animal Science*. 2006. Cornell University, Ithaca, NY 14850.
47. Chen Y, Yang Y, Miller ML, Shen D, Shertzer HG, Stringer KF, Wang B, Schneider SN, Nebert DW, Dalton TP. Hepatocyte-specific Gc/c deletion leads to rapid onset of steatosis with mitochondrial injury and liver failure. *Hepatology*. 2007; 45:1118-1128. <https://doi:10.1002/hep.21635>
48. Li S, Hosseini A, Danes M, Jacometo C, Liu J, Loor JJ. Essential amino acid ratios and mTOR affect lipogenic gene networks and miRNA expression in bovine mammary epithelial cells. *J Anim Sci Biotechnol. Journal of Animal Science and Biotechnology*; 2016;7(1):44. <https://doi:10.1186/s40104-016-0104-x>