

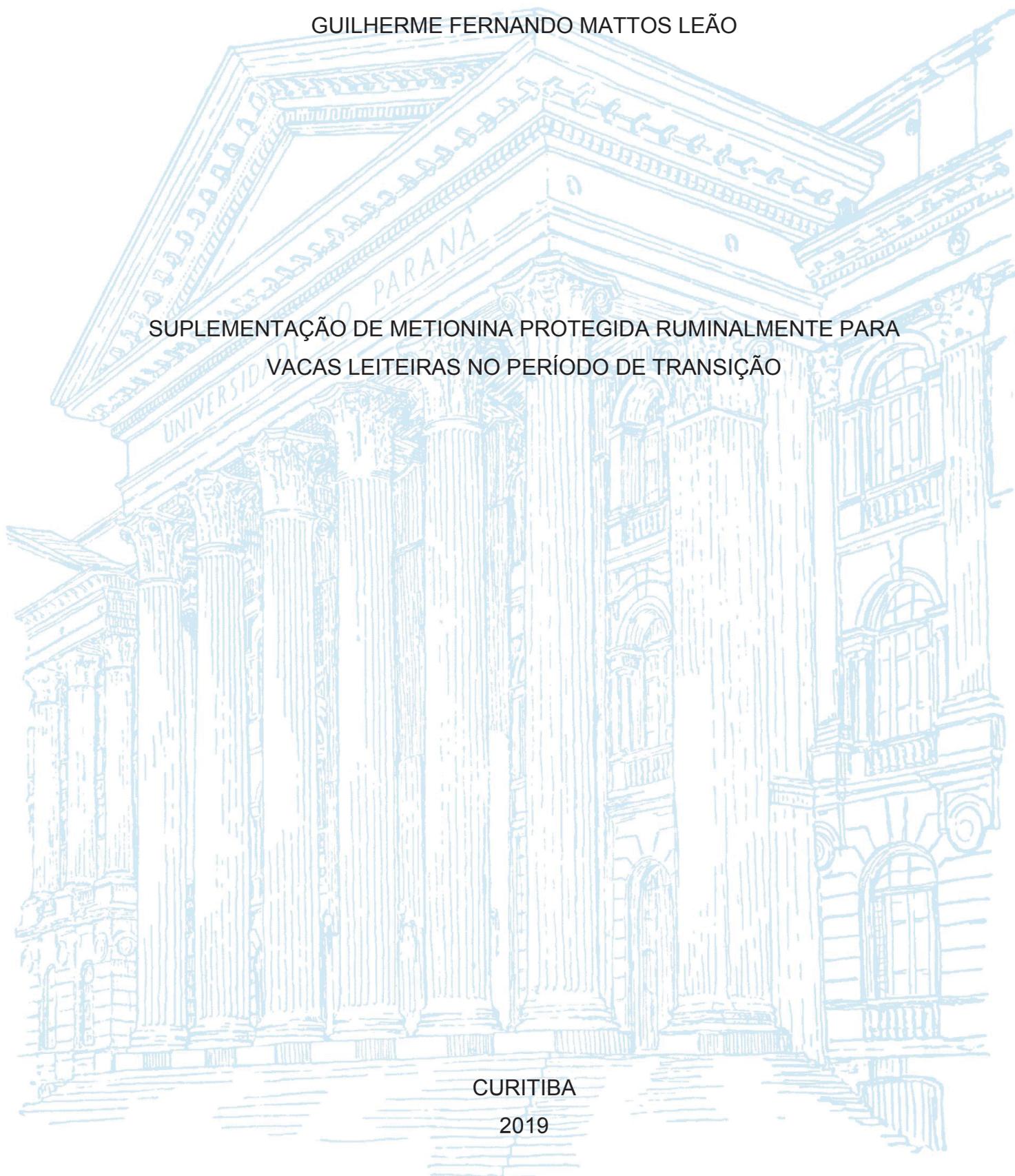
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUILHERME FERNANDO MATTOS LEÃO

SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA RUMINALMENTE PARA  
VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO

CURITIBA

2019



GUILHERME FERNANDO MATTOS LEÃO

SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA RUMINALMENTE PARA VACAS  
LEITEIRAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração Zootecnia – Nutrição e Produção de Herbívoros e Forragicultura, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título Doutor em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida

CURITIBA

2019

Leão, Guilherme Fernando Mattos

Suplementação de metionina protegida ruminalmente para vacas leiteira no período de transição. / Guilherme Fernando Mattos Leão. - Curitiba, 2019.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.  
Orientador: Rodrigo de Almeida.

1. Bovinos de leite. 2. Nutrição animal - Suplementação. 3. Aminoácidos na nutrição animal. 4. Gordura do leite. 5. Saúde animal.  
5l. Almeida, Rodrigo de. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOTECNIA -  
40001018082P0

### TERMO DE APROVAÇÃO

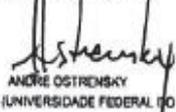
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOTECNIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **GUILHERME FERNANDO MATTOS LEAO**, intitulada: **SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA RUMINALMENTE PARA VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO**, sob orientação do Prof. Dr. RODRIGO DE ALMEIDA, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de Doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

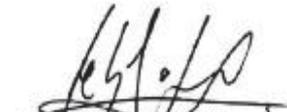
Curitiba, 28 de Novembro de 2019.



RODRIGO DE ALMEIDA  
Presidente da Banca Examinadora



ANDRÉ OSTRENSKY  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



FELIPE CARDOSO DE CARDOSO  
Avaliador Externo (UNIVERSITY OF ILLINOIS)



SIMONE GELELE DE OLIVEIRA  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

“Hoje me sinto mais forte, mais feliz que sabe, só levo a certeza que muito pouco eu sei, ou nada sei”.

“Como um velho boiadeiro levando a boiada, eu vou tocando os dias pela longa estrada, estrada eu sou”.

“Todo mundo ama um dia, todo mundo chora, um dia a gente chega, no outro vai embora. Cada um de nós compõe a sua história e cada ser em si carrega o dom de ser capaz e ser FELIZ”.

(Almir Sater)

Às vacas leiteiras

**OFEREÇO**

A Deus, tropeiro do universo, que possibilitou minha existência e que me acompanha  
nesta caminhada pela invernada da vida.

À minha família, por ser minha grande fonte de felicidade e alegria.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, patrão celestial, por ter me guiado e me protegido durante todas as viagens e provações que este doutorado demandou. A Deus sobre todas as coisas.

Agradeço primeiramente aos meus pais, Fernando e Janete, que moldaram meu caráter e que principalmente me deram exemplo de honestidade, fibra, coragem, fé e humildade. Da mesma forma, agradeço imensamente à minha tia Josiane, minha avó Geralda, meu irmão Daniel e minha cunhada Ketlyn, pela colaboração no dia-a-dia bem como o carinho, amor e confiança em mim depositados. Todos, a seu modo, não mediram esforços para garantir que este sonho fosse possível. Em especial agradeço a minha mãe, por ter me estimulado desde criança para ser o que sou hoje, por todo apoio mental, psicológico e inclusive financeiro (nos momentos de maior dificuldade para cumprimento desta etapa), que em nenhum momento deixou de acreditar em mim e na importância deste título. O meu muito obrigado; serei eternamente grato a vocês por tudo.

Agradeço também à Sthefany, a qual foi peça importante nesta conquista, seja pelas discussões técnicas, pelas infinitas ajudas nas coletas (e demais trabalhos do doutorado), pelos aprendizados que você me proporcionou (pelos mais de 8 anos juntos), como também pelo amor, apoio, confiança e pelo estímulo de me fazer ser uma pessoa melhor a cada dia. Ao seu José Luiz, dona Marlei e a Therency também agradeço, por constituírem minha segunda família. A Dona Marlei, em especial, gostaria de agradecer a acolhida em sua casa, na qual me tratou como um filho, para todo o desenvolvimento do experimento de campo.

A todos os meus amigos, gostaria de agradecer por fazerem minha caminhada até aqui certamente mais feliz e que me proporcionaram muitas horas de diversão. Aos colegas do Grupo do Leite da UFPR, em especial, Eloize, Giancarlo, Tainara e Elinton pelas ajudas que me concederam durante a minha trajetória.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, professor Dr. Rodrigo de Almeida, por ter me orientado em todo o processo de doutorado e por ser uma grande referência profissional.

À Fazenda Frankanna, meu muito obrigado, na pessoa do Maurício Greidanus e do Luís Moroz, bem como toda a equipe do manejo. Lugar fantástico, no qual pude desempenhar todo o trabalho de campo.

Gostaria de agradecer a Adisseo, na pessoa da Fernanda Lopes, sem a qual não seria possível a realização do meu experimento. Gostaria de agradecer a Cooperativa Auriverde, na pessoa do Arceli Nicolodi, Jairo Sedovski, Emanuela Valer e Diogo Cembranel, por todo o tempo em que participei do seu quadro técnico e que sempre se mostraram dispostos em me ajudar durante a condução do meu doutorado. À Cargill Animal Nutrition (Nutron Alimentos) por também ter entendido minhas limitações e me auxiliado enquanto funcionário da empresa. À Castrolanda Cooperativa Agroindustrial, especificamente a toda equipe técnica (Setor Agrônomo, Qualidade do Leite, Nutrição, Gestão, Assistência SP) e a gerência de Negócios Leite, na pessoa do Eduardo Ribas e coordenação técnica, na pessoa do senhor HuiBERT Pieter Janssen, também agradeço por ter fornecido todo apoio necessário nas partes finais da condução deste projeto. Muito obrigado!

À Medicina Veterinária, nobre profissão, que me faz ser realizado no âmbito profissional de minha vida. Ao Sítio Maria Adelaide, berço de meu interesse pela área agropecuária, lar de meus anseios e paz de meu espírito. Às vacas leiteiras, paixão antiga, que sem as quais nada deste estudo teria sentido. À erva-mate, por toda a concentração proporcionada durante os momentos de estudo.

Além de tudo, gostaria de saudar a memória do meu querido avô, Walter, exemplo de vida, de pessoa e de homem, que por certo levarei por toda a vida. Lamento que não esteja aqui hoje para me ver como Médico Veterinário e Doutor em Zootecnia, mas certamente, onde quer que esteja, saberá a importância que teve nesta conquista.

Sem sombra de dúvidas, este doutorado, embora que não me faça melhor do que ninguém nesta vida, me fez grandemente melhor que eu mesmo. A vida é um processo; cabe a nós aproveitar o máximo. Muito obrigado!

## RESUMO

O período de transição representa uma fase de alto desafio para as vacas leiteiras. Algumas estratégias relatadas em literatura, como a suplementação de metionina protegida ruminalmente (MPR), podem auxiliar a maximizar a produção e o sistema imune. Sendo assim, o objetivo do estudo foi avaliar a suplementação de MPR para vacas no período de transição sobre o desempenho produtivo e aspectos metabólicos. Foram utilizadas 166 vacas Holandesas pertencentes a um rebanho comercial na região centro-oriental do Estado do Paraná, sendo 108 multíparas e 58 primíparas, bloqueadas por ordem de parto e data prevista de parto. Os animais experimentais foram divididos em dois grupos: Controle – dieta controle sem suplementação; Metionina – dieta controle com suplementação de MPR (Smartamine®) na inclusão de 8 g/animal/dia do produto durante o período pré-parto, e de 15 g/animal/dia no período pós-parto. A produção de leite foi mensurada diariamente e para análise de sólidos do leite, cada vaca teve duas coletas semanais. Colheitas de sangue foram realizadas nos dias -14, -7, +1, +7 e +14, relativos ao parto, durante o período da manhã, por punção da veia ou artéria coccígea. Descarte e enfermidades foram diagnosticados e analisados diariamente. Os dados de desempenho produtivo e aspectos metabólicos foram analisados pelos procedimentos MIXED e GLIMMIX do SAS, com a inclusão dos efeitos fixos de ordem de parição e tratamento e o efeito aleatório de vaca, e nas análises de variáveis com amostras repetidas, o efeito de tempo também foi incluído no modelo. A produção de leite média aos 60 dias em leite ( $P = 0,87$ ) e corrigida para sólidos ( $P=0,47$ ) foi semelhante entre os tratamentos. No entanto, houve tendência dos animais suplementados com MPR apresentarem maiores percentuais de gordura no leite (4,40 vs. 4,07%;  $P=0,07$ ) nas primeiras duas semanas após o parto. Animais suplementados com MPR apresentaram percentuais de proteína (3,46 vs. 3,38;  $P=0,20$ ) e caseína (2,73 vs. 2,65%;  $P=0,19$ ) similares ao grupo controle. Além disso, as concentrações de metabólitos sanguíneos foram semelhantes ( $P>0,10$ ) entre os tratamentos, no entanto, houve tendência de animais suplementados com MPR apresentarem menores valores de AST ( $P=0,08$ ) e maiores de cálcio sérico ( $P=0,05$ ) no dia +1 e de albumina ( $P=0,06$ ) no dia +14. Além disso, apesar da morbidade não diferir entre tratamentos ( $P=0,87$ ), o descarte nos primeiros 60 dias de lactação foi menor (12,1% vs. 2,4%;  $P=0,03$ ) para os animais recebendo MPR. De forma geral, os resultados sugerem um efeito da MPR sobre a porcentagem de gordura do leite, bem

como sobre o descarte nos primeiros 60 dias pós-parto, mesmo com modesta influência nos metabólitos sanguíneos.

**Palavras-chave:** Aminoácido; Descarte; Gordura do leite; Saúde.

## ABSTRACT

The transition period represents a challenging phase for dairy cows. Some strategies reported in the literature, such as rumen-protected methionine (RPM) supplementation, may help cows to improve production and immune system. Thus, the objective of this study was to evaluate the RPM supplementation for transition dairy cows on productive performance and metabolic aspects. A total of 166 Holstein cows from a commercial herd were used, 108 multiparous and 58 primiparous, blocked by calving order and expected calving date and divided into two groups: Control; control diet without supplementation and Methionine; control diet supplemented with RPM (Smartamine®) in the proportion of 8 g/animal/day during the prepartum period and 15 g/animal/day in the postpartum period. Milk production was verified daily and for solids analysis, each cow was submitted to two milk sampling. Blood samples, in turn, were performed on the days -14, -7, +1, +7 and +14 relative to calving, during the morning, by puncture of the coccygeal artery or vein. Culling and animal diseases were diagnosed and analyzed daily. Productive performance data and metabolic aspects was analyzed by MIXED AND GLIMMIX procedures from SAS. The average 60-day milk yield in milk ( $P = 0.87$ ) and corrected for solids ( $P = 0.47$ ) were similar between treatments. However, it was observed a trend for animals supplemented with RPM to have higher milk fat contents (4.40 vs. 4.07%,  $P = 0.07$ ). In contrast, animals having RPM did not show milk protein (3.46 vs. 3.38;  $P = 0.20$ ) or casein (2.73 vs. 2.65%;  $P = 0.19$ ) percentages, as well as the other milk components ( $P > 0.10$ ) higher than the control group. In addition, blood metabolites were similar between treatments ( $P > 0.10$ ), however, there was a trend for animals receiving RPM to have lower AST ( $P = 0.08$ ) and higher calcium ( $P = 0.05$ ) values at day +1 and albumin ( $P = 0.06$ ) at day +14 than animals not receiving RPM. In addition, although morbidity did not differ between treatments ( $P = 0.87$ ), culling rate in the first 60 d of lactation was lower for animals receiving RPM (12.1% vs. 2.4%;  $P = 0.03$ ) than animals not receiving RPM. Overall, the results suggest an effect of RPM on milk fat as well as culling in the first 60d, even though not influencing blood metabolites.

**Keywords:** Amino acid; Culling; Milk fat; Health.

## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO I: CONSIDERAÇÕES GERAIS**

FIGURA 1	Mudança energética, avaliando energia líquida de lactação, durante o período de transição de vacas e novilhas.....	21
FIGURA 2	Magnitude de mobilização de proteína e gordura de vacas leiteiras no período de transição.....	27
FIGURA 3	Amplitude de funções da metionina no organismo de vacas leiteiras.....	35

### **CAPÍTULO II: SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA E SEUS EFEITOS NOS ASPECTOS PRODUTIVOS E METABÓLICOS DE VACAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO**

FIGURA 1	Esquema de colheitas sanguíneas para soro e plasma (▼), para fita de BHB (↓) e semente de soro (O).....	57
FIGURA 2	Avaliação da curva de lactação nos primeiros 90 dias de lactação em vacas suplementadas com MPR durante o período de transição.....	62
FIGURA 3	Avaliação de enzimas hepáticas de vacas suplementadas com MPR durante o período de transição.....	67
FIGURA 4	Avaliação de metabólitos energéticos de vacas suplementadas com MPR durante o período de transição.....	68
FIGURA 5	Avaliação de parâmetros do metabolismo proteico de vacas leiteiras suplementadas com MPR durante o período de transição.....	70
FIGURA 6	Avaliação de cálcio total e bilirrubina de vacas suplementadas com MPR durante o período de transição.....	71
FIGURA 7	Avaliação do descarte ao longo da lactação de vacas suplementadas com MPR durante o período de transição.....	75
FIGURA 8	Avaliação da prenhez ao longo da lactação de vacas suplementadas com MPR durante o período de transição.....	77
FIGURA 9	Avaliação da concentração de metionina plasmática de vacas suplementadas com MPR durante o período de transição.....	79

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I: CONSIDERAÇÕES GERAIS

TABELA 1	Valores de referência de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e $\beta$ -hidroxibutirato (BHBA), para vacas leiteiras no período de transição.....	25
TABELA 2	Efeito da variação dos parâmetros metabólicos no período de transição sobre as células do sistema imune de vacas leiteiras. ....	33
TABELA 3	Principais resultados produtivos encontrados em literatura de vacas suplementadas com metionina no período de transição.....	38
TABELA 4	Principais resultados metabólicos encontrados em literatura de vacas suplementadas com metionina no período de transição.....	39

### CAPÍTULO II: SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA E SEUS EFEITOS NOS ASPECTOS PRODUTIVOS E METABÓLICOS DE VACAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO

TABELA 1	Dietas experimentais nos períodos pré-parto e pós-parto formuladas a partir das exigências do NRC (2001).....	54
TABELA 2	Composição nutricional das dietas experimentais nos períodos pré-parto e pós-parto formuladas a partir das exigências do NRC (2001) .....	55
TABELA 3	Composição nutricional dos alimentos volumosos.....	55
TABELA 4	Produção e composição do leite de vacas leiteiras suplementadas com MPR durante o período de transição....	61
TABELA 5	Avaliação do peso e condição corporal de vacas leiteiras suplementadas com MPR durante o período de transição....	65
TABELA 6	Análise de metabólitos de vacas leiteiras suplementadas com MPR durante o período de transição.....	66
TABELA 7	Avaliação do BHB em fitas durante o período pós-parto de vacas leiteiras suplementadas ou não com MPR no período de transição.....	74
TABELA 8	Avaliação de doenças e descarte de vacas leiteiras suplementadas com MPR durante o período de transição....	75
TABELA 9	Avaliação de parâmetros reprodutivos de vacas leiteiras suplementadas com MPR durante o período de transição....	76
TABELA 10	Avaliação de aminoácidos no plasma no dia +14 de vacas leiteiras suplementadas com MPR durante o período de transição.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGNE	Ácidos Graxos Não Esterificados
AST	Aspartato Aminotransferase
BHBA	Beta-Hidroxibutirato
ECC	Escore de Condição Corporal
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
IFH	Índice de Funcionalidade Hepática
MPR	Metionina Protegida Ruminalmente
MS	Matéria seca
PB	Proteína Bruta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CAPÍTULO I: CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>16</b>
1.1	INTRODUÇÃO GERAL.....	16
1.2	HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	17
1.3	OBJETIVOS GERAIS .....	17
1.4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1.	CARACTERIZAÇÃO DO PERÍODO DE TRANSIÇÃO .....	19
2.2	BIOLOGIA DO PERÍODO DE TRANSIÇÃO .....	19
2.2.1	Metabolismo energético .....	19
2.2.2	Metabolismo proteico .....	26
2.2.3	Metabolismo mineral .....	29
2.2.4	Inflamação, estresse oxidativo e efeitos sobre o sistema imune durante o período de transição.....	31
2.2.5	Amplitude de funções da metionina e importância da suplementação .....	33
2.3	REFERÊNCIAS .....	41
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO II: SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA E SEUS EFEITOS NOS ASPECTOS PRODUTIVOS E METABÓLICOS DE VACAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO.....</b>	<b>51</b>
3.1	INTRODUÇÃO.....	51
3.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	52
3.2.1	Dietas experimentais .....	53
3.2.2	Avaliação do desempenho e composição do leite.....	56
3.2.3	Perfil metabólico, sistema imunológico, transferência de imunidade passiva e incidência de doenças .....	56
3.2.4	Índices reprodutivos e descarte.....	59
3.2.5	Delineamento experimental e análises estatísticas ....	59
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60
3.4	CONCLUSÕES.....	79
3.5	AGRADECIMENTOS.....	80
3.6	REFERÊNCIAS .....	80
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>87</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>88</b>
	<b>APÊNDICE 1 - CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) .....</b>	<b>100</b>

# 1 CAPÍTULO I: CONSIDERAÇÕES GERAIS

## 1.1 INTRODUÇÃO GERAL

A alimentação constitui o setor mais oneroso em termos financeiros de uma propriedade leiteira, podendo representar até 60% dos custos totais de produção. Sendo assim, é necessário sempre otimizar recursos, compreendendo principalmente o momento mais oportuno para se incluir aditivos nutricionais.

As vacas leiteiras, em linhas gerais, possuem ciclo produtivo definido. De forma genérica, as vacas iniciam sua lactação com o parto, produzem colostro, atingem pico de produção aos 45-60 dias em leite (DEL), produzem leite por um período médio de 305 a 365 dias e encerram a lactação, normalmente, 45-60 dias antes do próximo parto previsto. Embora, aparentemente simples, a curva de lactação de vacas especializadas possui uma série de pontos críticos os quais, sem os devidos cuidados podem ocasionar intensas perdas produtivas e sanitárias, sendo o período de transição um dos principais exemplos.

O período de transição pode ser definido como sendo o intervalo entre as três semanas anteriores e as três semanas posteriores em relação ao parto. Trata-se de um período de alta relevância para as vacas leiteiras, uma vez que é marcado por intensas mudanças metabólicas e hormonais que impactam sobre toda a lactação. A literatura é unânime em ressaltar que neste período há maior incidência de doenças, o que explica os maiores índices de descarte involuntário, que são predispostos pela alta variação hormonal e metabólica.

Para diminuir a ocorrência de doenças ou se otimizar os aspectos produtivos, vários estudos têm sugerido a inclusão de aditivos ou nutrientes para modular esta fase. Na avaliação desta categoria, a metionina protegida ruminalmente (MPR) tem se destacado por melhorar a produção de leite, a porcentagem de proteína do leite, com redução na incidência de doenças e melhorias no perfil metabólico. Vale ressaltar que a MPR tem papel de destaque pela sua grande amplitude de funções no organismo animal sendo o primeiro aminoácido limitante para vacas leiteiras.

Ademais, o aminoácido metionina também pode ser definido como uma molécula funcional por participar e regular vias metabólicas principais para

aprimorar saúde, sobrevivência, crescimento, desenvolvimento, lactação e reprodução.

Embora estes resultados sejam extremamente promissores, todavia, ainda não há consenso das magnitudes das respostas produtivas, sanitárias e metabólicas deste aditivo neste período, principalmente em experimentos conduzidos em rebanhos comerciais.

A fim de atingir os objetivos propostos, esta tese foi organizada em capítulos baseando-se na normatização de trabalhos acadêmicos da Universidade Federal do Paraná, atualizada em 2017.

O Capítulo 1 corresponde a revisão de literatura, com uma abordagem sobre a biologia da vaca no período de transição e a amplitude de funções e uso da metionina protegida ruminalmente. Esse capítulo trata de informações que servirão de base para o capítulo seguinte.

O Capítulo 2 trata da suplementação de metionina protegida e seus efeitos nos aspectos produtivos e metabólicos de vacas no período de transição. Esse capítulo teve como objetivo avaliar os parâmetros produtivos, bioquímicos, reprodutivos e o descarte de vacas suplementadas ou não com metionina protegida ruminalmente.

## 1.2 HIPÓTESE CIENTÍFICA

A suplementação com metionina protegida ruminalmente (MPR) para vacas leiteiras no período de transição pode trazer diversos benefícios produtivos, aumentando produção de leite e percentual de proteína do leite, além de propiciar maior saúde aos animais, pelos seus ganhos metabólicos. A hipótese é que a MPR pode influenciar estes aspectos supracitados sendo um nutriente a ser avaliado no programa nutricional de vacas no período de transição.

## 1.3 OBJETIVOS GERAIS

- Demonstrar os efeitos da suplementação com metionina protegida ruminalmente durante o período de transição sobre os aspectos produtivos e bioquímicos de vacas leiteiras.

#### 1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar resposta a suplementação de metionina protegida sobre a produção de leite no início de lactação.
- Observar se há resposta da suplementação sobre a qualidade do colostro.
- Verificar se a suplementação de MPR no período de transição modifica a composição do leite em vacas recém-paridas.
- Verificar a influência da MPR sobre o perfil metabólico de vacas no período de transição, dando especial enfoque no perfil energético, proteico, mineral e enzimas hepáticas
- Verificar a prevalência de distúrbios metabólicos no pós-parto de vacas suplementadas ou não com metionina protegida.
- Verificar a influência da MPR sobre o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras.
- Mensurar se há ou não diferença no descarte involuntário nos primeiros 60 dias de lactação em vacas suplementadas com MPR.
- Avaliar o impacto da suplementação de MPR sobre a concentração de aminoácidos plasmáticos essenciais e não essenciais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. CARACTERIZAÇÃO DO PERÍODO DE TRANSIÇÃO

O período de transição pode ser definido como sendo o intervalo entre as três semanas anteriores e as três semanas posteriores em relação ao momento do parto (DRACKLEY, 1999). Trata-se de um período do ciclo produtivo que possui alta relevância, uma vez que é marcado por intensas mudanças fisiológicas que modulam diversas esferas do metabolismo (e.g., metabolismo energético, proteico, mineral), que conseqüentemente impactam no sistema imune das vacas leiteiras. Com isto, a literatura é unânime em ressaltar que neste período há maior incidência de doenças, o que corrobora com os maiores índices de descarte involuntário, que são predispostos pela alta variação hormonal e metabólica (BURKE et al., 2010; ROCHE et al., 2013).

Todas essas alterações fazem parte de uma cascata de eventos orquestrados ou coordenados no metabolismo dos tecidos corporais para sustentar um estado fisiológico, também conhecido por homeorrese da vaca periparturiente (BAUMAN e CURRIE, 1980). Estas alterações endócrinas fazem parte da biologia natural de vacas periparturientes, necessárias para o parto e lactogênese, as quais podem ter efeitos deletérios se forem amplificadas pelo manejo inadequado ou minimizados com boas práticas de produção.

### 2.2 BIOLOGIA DO PERÍODO DE TRANSIÇÃO

#### 2.2.1 Metabolismo energético

Um ponto-chave do metabolismo energético das vacas é primeiramente a depressão no consumo de matéria seca (CMS), a qual se inicia 10 a 15 dias antes do parto e vai diminuindo progressivamente na medida que o parto se aproxima. A redução no consumo de MS normalmente observada é da ordem de 30%, sendo que o menor CMS ocorre no dia do parto (DRACKLEY, 1999; NRC, 2001).

Nos últimos anos tornaram-se mais comuns nesta fase, dietas de menor concentração energética, com energia líquida de lactação próximas a 1,40-1,45 Mcal de EL<sub>L</sub>/kg de MS, principalmente por garantirem menor balanço energético

negativo (BEN) no pós-parto (CARDOSO et al., 2013; ZENOBI et al., 2018). Tais dietas evitam a deposição de gordura visceral (DRACKLEY et al., 2014) e, com isto, proporcionam uma melhor adaptação do organismo da vaca as variações energéticas depois do parto, garantindo assim um BEN menos pronunciado.

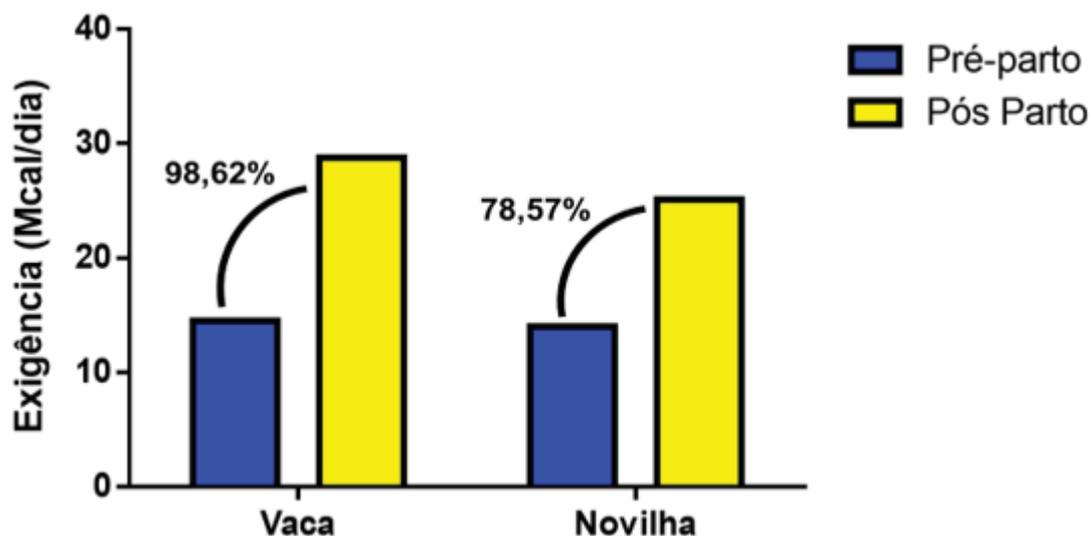
Entretanto, em linhas gerais, para atingir esse nível de energia nas dietas, é necessária uma maior inclusão de forragens, elevando os teores de fibra em detergente neutro (FDN) oriundo de forragem, o que tende a regulação física do consumo (ALLEN et al., 2009), se os alimentos incluídos forem de baixa qualidade e/ou os níveis de FDN oriundo de forragem (FDNf) forem superiores a 50% na MS (aproximadamente 4,5 a 5,0 kg de MS/dia ou 0,7 a 0,8% do peso vivo).

Além disto, o CMS pode também ser modulado pelo ambiente. Fatores estressantes, como manejo inadequado de agrupamento dos animais (e.g., vacas e novilhas acomodadas no mesmo lote), espaço de cocho reduzido e dimensionamento inadequado de camas são fatores que induzem competição e afetam o CMS pleno dos animais. Somado a isso, há grande influência do estresse térmico, que conforme demonstrado por Tao et al. (2011), pode gerar um decréscimo de aproximadamente 1,5 kg no CMS no pré-parto. Vacas em estresse térmico durante o período seco, com índice de temperatura e umidade (ITU) maior que 68 nas 6 a 8 semanas antes do parto, produzem de 5 a 7 kg de leite por dia a menos durante a lactação do que vacas resfriadas com aspersores e ventiladores quando secas, mesmo quando todas as vacas são resfriadas durante toda a lactação (TAO e DAHL, 2013).

Sendo assim, a minimização de fatores que reduzam o CMS no pré-parto é essencial para o sucesso do período de transição. Outro fato que demonstra isto é que, segundo o NRC (2001), do ponto de vista energético, há um dramático aumento na exigência devido primeiramente a alta necessidade energética para a produção de colostro e leite.

Para ilustrar tal fato, Drackley (2004) comparou a exigência energética total de vacas (725 kg de PV, produção de leite de 25 kg/d com 4% de gordura na 1ª semana de lactação) e novilhas (570 kg de PV, produção de leite de 20 kg/d com 4% de gordura na 1ª semana de lactação). Foi observado um aumento de 99% da exigência energética do pré para o pós-parto de vacas (de 14,5 Mcal/d para 28,8 Mcal/d) e de 79% para novilhas (de 14,0 Mcal/d para 25,0

Mcal/d) (Figura 1). Portanto, se o CMS for ainda menor, notadamente devido às altas demandas energéticas ou a uma depressão no CMS ainda mais intenso no pré-parto, haverá um BEN exacerbado.



**Figura 1.** Mudança energética, avaliando energia líquida de lactação, durante o período de transição de vacas e novilhas (Adaptado de Drackley, 2004).

Ainda dentro do contexto energético, outro ponto relevante é que a glicose, principal combustível celular, tem requerimento obrigatório por certos tipos celulares como células do sistema nervoso, mamário, renal e também eritrócitos para garantir a homeostase (ASCHENBACH et al., 2010). Todavia, nos ruminantes em período de transição, através de mecanismos homeorréticos, a glicose deixa de ser captada pelos tecidos periféricos e tem como destino prioritário a glândula mamária, onde é convertida em lactose e tem como principal função atuar como regulador osmótico para a produção de colostro e leite (BAUMAN e CURRIE, 1980). Consequentemente, a maior parte da demanda de glicose para produção de leite acaba sendo atendida pela gliconeogênese (HERDT, 2000).

A gliconeogênese é um processo anabólico de produção de glicose, que ocorre principalmente no fígado, através de precursores glicogênicos que não são carboidratos. Os principais precursores da gliconeogênese são o propionato advindo da fermentação ruminal, os aminoácidos glicogênicos resultantes da mobilização de tecido muscular e o glicerol resultante do metabolismo lipídico (ASCHENBACH et al., 2010). Em ruminantes, o propionato é o precursor de maior importância, pois corresponde a 60-74% da gliconeogênese hepática. No

entanto, em virtude da limitação de consumo de MS conforme supracitado, há também uma limitação de propionato para síntese de glicose (DRACKLEY, 2004; ASCHENBACH et al., 2010).

O direcionamento prioritário de glicose à glândula mamária pode ser em partes atribuído ao quadro de resistência à insulina. A insulina é um hormônio peptídico, secretado pelo pâncreas em resposta ao nível de glicose sérica, desempenhando papel importante no armazenamento de energia (i.e., promove síntese de glicogênio, estimulação da síntese de gordura e armazenamento nos adipócitos através da inibição da lipase sensível a hormônio - LSH), possuindo papel antagônico ao glucagon. Adicionalmente, a insulina atua na captação da glicose em auxílio às moléculas transportadoras de glicose (GLUT), sendo o principal representante o GLUT-4, o qual capta a glicose através de difusão facilitada (AZEVEDO e COELHO, 2016). No entanto, vacas durante o período de transição possuem sensibilidade reduzida dos tecidos para responder as concentrações normais de insulina, diminuindo a expressão de GLUT-4 e aumentando a de GLUT-1, o único transportador que é independente a insulina e tem suas maiores concentrações na glândula mamária (GRUMMER, 2016).

O grau de resistência à insulina depende do nível produtivo da vaca, sendo que vacas mais produtivas, principalmente aquelas com genética mais apurada, apresentam maiores predisposições a este fenômeno (CHAGAS et al., 2009). Ademais, aparentemente vacas que são secas com maiores escores de condição corporal (ECC), também possuem uma maior predisposição de resistência à insulina devido ao alto nível de ceramidas no plasma (i.e., esfingolípídios correlacionados com a magnitude da lipólise), implicando em maior probabilidade da ocorrência de desordens metabólicas (RICO et al., 2015).

Devido à resistência à insulina, somado com os níveis plasmáticos naturalmente baixos deste hormônio no peri-parto, há estímulo na atividade da LSH por parte do glucagon e catecolaminas. Este quadro, por conseguinte, implica em lipólise, o qual resulta em aumento dos níveis séricos de ácidos graxos não esterificados (AGNE). Os AGNE são compreendidos como ácidos graxos oriundos a partir dos triglicerídeos e somente ligados à albumina, a qual tem por função carregá-los até o tecido hepático. Quando no fígado, há influxo de AGNE para dentro dos hepatócitos, onde podem ser deslocados para dentro da mitocôndria através do complexo carnitina palmitoil transferase I (CPT-I). Uma

vez dentro da mitocôndria, os ácidos graxos sofrem oxidação completa através da  $\beta$ -oxidação, onde acetil-CoA e  $\text{CO}_2$  são formados (DRACKLEY, 1999). Além disto, os AGNE também podem contribuir no teor de gordura do leite, sob a forma de ácidos graxos pré-formados, participando em mais de 40% dos ácidos graxos totais do leite em vacas recém-paridas (ADEWUYI et al., 2005).

Um ponto digno de nota é que, diferentemente da tendência de regulação física do CMS no pré-parto, conforme discutido anteriormente, no pós-parto, a oxidação de AGNE, lactato, aminoácidos e propionato, aumenta o status energético do fígado (aumento de relação ATP/ADP), o que, através da redução da taxa de estimulação de nervos vagais aferentes, comunicam o hipotálamo, ativando o centro da saciedade e garantindo uma resposta hipofágica (ALLEN et al., 2009).

Essa regulação metabólica do CMS é denominada teoria da oxidação hepática (HOT) devido ao alto nível de degradação de “combustíveis” neste tecido (ALLEN et al., 2009). No entanto, conforme o estado lipolítico das vacas aumenta, necessariamente aumenta também a importância da regulação pela teoria da oxidação hepática, ou seja, vacas em BEN exacerbado irão ter CMS mais deprimido. Fisiologicamente, após o parto, o CMS vai aumentando gradativamente, mas em ritmo mais lento que o incremento da produção de leite, e o animal atinge o ápice do consumo alimentar entre a 10<sup>a</sup> e 14<sup>a</sup> semana de lactação (NRC, 2001).

Todavia, a oxidação completa dos AGNE é limitada a nível hepático, principalmente pelo pool de oxaloacetato, necessário para as reações anapleróticas do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) ou ciclo de Krebs, que faz a junção com o acetil-CoA, formando o citrato, o primeiro intermediário do ciclo. Posteriormente, as coenzimas reduzidas que são produzidas no ciclo gerarão os equivalentes ATP através da cadeia transportadora de elétrons (WHITE, 2015). Sendo assim, se há falta de oxaloacetato naturalmente há redução no processo de  $\beta$ -oxidação, pois a quantidade de acetil-CoA disponível supera a sua capacidade de utilização no ciclo de Krebs (GONZÁLEZ e SILVA, 2006).

Para se aumentar o pool de oxaloacetato, existem enzimas, a exemplo da piruvato carboxilase (PC) que tem por função prover ao sistema a transformação de piruvato a oxaloacetato, aumentando o poder oxidativo do TCA e incrementando a sua eficiência hepática. Contudo, em casos de alta demanda

por glicose (e.g., início da lactação), há aumento na gliconeogênese, e consequentemente da atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), que capta os metabólitos intermediários, principalmente o próprio oxaloacetato, gerando depleção do pool deste metabólito no meio, reiterando a limitação na via oxidativa (WHITE, 2015).

Dessa forma, pode ocorrer oxidação parcial dos AGNE, o qual resulta na produção de corpos cetônicos, dentre os quais o  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB), de mensuração mais estável, sobretudo a nível sérico. Importante ressaltar que os corpos cetônicos também são fontes energéticas alternativas para tecidos como o nervoso e o cardíaco; logo, níveis basais de BHB são esperados no perfil metabólico de vacas leiteiras no período de transição (McART et al., 2013).

Os níveis de AGNE e BHB refletem ainda o grau de lipomobilização, ou seja, a magnitude de perda do ECC. O BEN, quando exacerbado (perda de um ponto ou mais de ECC), com consequente aumento nos valores desses metabólitos, interfere negativamente nas funções produtiva e reprodutiva de vacas leiteiras (ROCHE et al., 2009). Conforme supracitado, embora valores basais sejam esperados para gerar uma adaptação das vacas ao BEN, diversos pesquisadores têm sugerido valores limiares (*cut-point*), onde animais que tenham valores acima deste limite começam a apresentar decréscimos produtivos, reprodutivos ou ocorrência de distúrbios metabólicos.

Segundo LeBlanc. (2005), as mensurações das concentrações de AGNE e BHB podem ser realizadas já no pré-parto (4 a 10 dias antes do parto). O comportamento natural do AGNE seria que, em vacas saudáveis, esse parâmetro aumenta a partir dos quinze dias que antecedem o parto, alcançando o pico no dia do parto ou no primeiro dia pós-parto, reduzindo sua concentração nos dias seguintes devido ao aumento do CMS (LEBLANC, 2005; ADEWUYI et al., 2005). A Tabela 1 mostra os valores limites (*cut-point*) desses metabólitos verificados em vários estudos avaliando a prevalência de doenças durante o período de transição.

Por exemplo, segundo Chapinal et al. (2012), a concentração plasmática de AGNE  $> 0,5$  mEq/L no pré-parto está relacionada com uma perda produtiva de 1,6 até 3,2 kg/d de leite durante os 4 primeiros controles leiteiros. Além disso, AGNE  $> 1,0$  mEq/L no pós-parto ( $> 30\%$  do rebanho) representa uma

probabilidade menor de prenhez na primeira inseminação (CHAPINAL et al., 2012).

**Tabela 1.** Valores de referência de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) para vacas leiteiras no período de transição.

<b>Autores</b>	<b>Pré-Parto</b>	<b>Pós-Parto</b>
AGNE (mEq/L)		
LeBlanc (2005)	$\leq 0,3$	-
Quiroz-Rocha et al. (2009)	$\leq 1,0$	0,1 a 1,4
Ospina et al. (2010)	$\leq 0,3$	$\leq 0,7$
Seifi et al. (2011)	-	$\leq 1,0$
McArt et al. (2013)	$\leq 0,3$	$\leq 0,7$
Chapinal et al. (2012) <sup>1</sup>	$\leq 0,5$	$\leq 0,7$
BHB (mmol/L)		
LeBlanc (2005)	-	$\leq 1,2$
Duffield et al. (2009)	-	$\leq 1,2$
Ospina et al. (2010)	-	$\leq 1,2$
Seifi et al. (2011)	-	$\leq 1,0$
Chapinal et al. (2012) <sup>1</sup>	$<0,6$	$\leq 1,4$
Suthar et al. (2013)	-	$\leq 1,2$

<sup>1</sup>Dados avaliados na primeira semana pós-parto.

McArt et al. (2012), em um estudo com incidência de cetose clínica e subclínica, avaliando 4 rebanhos e 1717 vacas leiteiras, determinaram valores limiares de 1,2 mmol/L para o metabólito BHB. Ou seja, animais que possuem valores acima desse limite são categorizados como apresentando cetose subclínica, enquanto que aqueles com valores acima de 2,9 mmol/L são definidos como apresentando cetose clínica (OETZEL, 2004).

Ademais, o último possível destino do AGNE a nível hepático seria sua re-esterificação. Os AGNE podem ser re-esterificados, armazenados como triglicerídeos e exportados na forma de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (DRACKLEY, 1999). Não obstante, os ruminantes têm uma capacidade limitada em sintetizar e secretar VLDL no fígado, sendo o excesso estocado no próprio parênquima hepático. Essa limitação promove uma maior deposição de

gordura no fígado e de distúrbios metabólicos, como esteatose hepática e cetose (BELL, 1995).

Ademais, o VLDL também é responsável pela exportação de grande parte do colesterol produzido no fígado. Devido a isso, a concentração sanguínea de colesterol total pode ser uma maneira indireta de predizer os níveis das lipoproteínas (NDLOVU et al., 2007), principalmente VLDL, uma vez que aproximadamente 90% dos lipídios ligados as lipoproteínas são transportados aos tecidos periféricos na forma de fosfolipídios e colesterol (KOZLOSKI, 2009).

Níveis plasmáticos baixos de colesterol indicam um quadro de déficit energético e comprometimento da função hepática, enquanto que, conforme demonstrado por Seifi et al. (2003), o colesterol está positivamente relacionado com o aumento na produção de leite, sendo um bom indicador da capacidade da vaca em mobilizar reservas lipídicas para a lactação. Além disto, a mudança de ECC também está correlacionada com níveis plasmáticos de colesterol, uma vez que vacas que perdem mais ECC no primeiro mês de lactação têm menores concentrações desse metabólito (KIM e SUH, 2003).

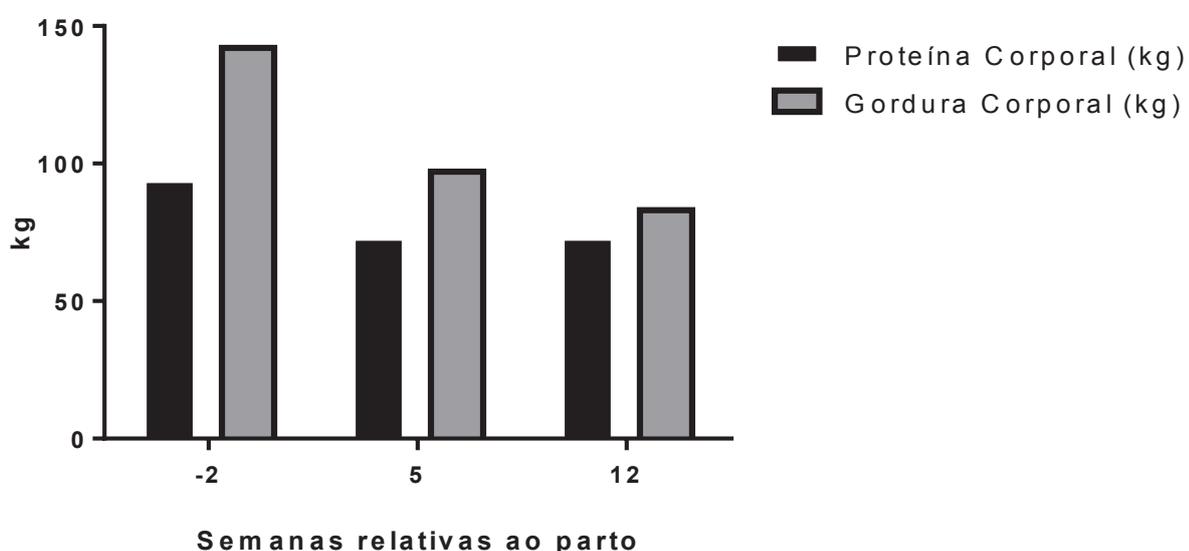
A relação AGNE:Colesterol tem sido sugerida como um índice para a avaliação da função do fígado e um indicador de lipidose hepática. Esse índice é calculado através da divisão entre níveis de AGNE e níveis de colesterol (AGNE:Colesterol), sendo expresso na base mmol/L. Vacas com aumento na relação AGNE:Colesterol no final do período seco ( $\geq 0,2$ ) e recém-paridas ( $\geq 0,3$ ) têm maior risco de apresentarem doenças no pós-parto (ANDERSON e RINGS, 2009). Kalaitzakis et al. (2010) concluíram que vacas saudáveis, 7 dias após o parto, apresentam uma média de 0,17 de relação AGNE:Colesterol.

### 2.2.2 Metabolismo proteico

Tipicamente, o *pool* de aminoácidos advém da absorção intestinal da proteína metabolizável (PM), contudo, durante o período de transição, há também uma condição de balanço negativo. Da mesma forma que o BEN, observa-se um balanço proteico negativo (BPN), também ocasionado pelo baixo CMS e pelo rápido aumento da produção. Durante o BPN, aumenta o catabolismo proteico com vistas a utilização de aminoácidos na gliconeogênese, além de propiciar matéria prima para a produção de proteínas de fase aguda,

em especial a haptoglobina, que são respostas a condição inflamatória do período peri-parto (BELL, 2000).

Komaragiri & Erdman (1997), com o intuito de avaliar a magnitude da mobilização de proteína e gordura corporal de vacas Holandesas durante o período de transição, se valendo de técnica de diluição de D<sub>2</sub>O e gerando equivalências para proteína, gordura e cinzas corporal, observaram que a maior diferença ocorreu entre as semanas -2 e +5 em relação ao parto, e para este período se observou uma mobilização total de 21 kg de proteína e 54 kg de gordura corporal, conforme demonstrado na Figura 2.



**Figura 2.** Magnitude de mobilização de proteína e gordura de vacas leiteiras no período de transição (Adaptado de Komaragiri e Erdman, 1997).

Adicionalmente, corroborando com tais achados, Van der Drift et al. (2012), avaliando 34 vacas no período de transição, concluíram que a mobilização proteica se inicia logo antes do parto, prolongando-se até a 4<sup>a</sup> semana de lactação. Um fato interessante observado pelos autores é que vacas que tinham menor mobilização proteica, apresentaram maiores valores de BHB sérico. Sendo assim, os autores sugeriram a hipótese de que uma mobilização proteica ao redor do parto pode prover substrato para as reações anapleróticas do TCA, aumentando a oxidação completa no fígado. Principalmente fornecendo aminoácidos, e a posteriori transformando-os em piruvato, pela ação da alanina aminotransferase (ALT) e subsequentemente a oxalacetato, pela ação da PC (WHITE, 2015), o qual é limitado nesta fase, conforme citado anteriormente.

Com relação à exigência proteica, o NRC (2001) indica aproximadamente 900 g/d de PM durante o período pré-parto. Somado a isso, Bell (2000) contempla que há necessidade adicional de 120 g/d para a síntese de tecido mamário, perfazendo um total de 1.100 a 1.200 g/d de PM na dieta. Num trabalho recente de Husnain e Santos (2019), os autores sugeriram um aporte diferenciado para novilhas e vacas; 800 g/d de PM às vacas e 1100 g/d de PM às nulíparas. No pós-parto, devido à grande amplitude de funções da PM, além do aumento da necessidade de precursores glicogênicos e o catabolismo descrito anteriormente, ainda não se tem uma exigência definida em termos de PM. Além disso, os requerimentos de PM no pós-parto dependem obviamente dos níveis produtivos alcançados no pós-parto, pois boa parte da exigência total de PM é para atender as demandas de lactação. No entanto, estima-se que a necessidade seria de pelo menos o dobro do indicado no pré-parto.

Com relação ao perfil proteico sérico, níveis de albumina, globulinas, proteínas totais e ureia tipicamente representam o metabolismo proteico. Adicionalmente, são estudados parâmetros indicadores do funcionamento hepático, tais como as enzimas ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase).

A albumina é o indicador nutricional mais sensível para determinar a longo prazo o status nutricional proteico do animal, sendo sua concentração afetada pelo funcionamento hepático (i.e., citoplasma de hepatócitos é sítio exclusivo para síntese desta proteína), disponibilidade de proteínas na dieta, equilíbrio hidroeletrólítico e pela presença de condição inflamatória, já que há redução da albumina em consequência do aumento de proteínas pró-inflamatórias (TENNANT e CENTER, 2008).

Albumina é caracterizada como uma proteína de fase aguda negativa (PFA-), juntamente com a paroxonase (PON); enquanto que haptoglobinas e ceruloplasminas são consideradas como proteínas de fase aguda positivas (PFA+). A PON também pode servir como um parâmetro para avaliar a atividade hepática, uma vez que a sua redução está associada ao comprometimento crônico do fígado (BIONAZ et al., 2007).

Vale ressaltar que a albumina é a proteína do soro mais osmoticamente ativa, enquanto que as globulinas são mais heterogêneas, tendo uma variedade de funções, representadas desde anticorpos até carreadores de lipídeos,

vitaminas e hormônios (PICCIONE et al., 2011). A albumina geralmente tem um comportamento mais estável ao longo do período de transição, enquanto que a globulina aparentemente tem um decréscimo maior em relação ao parto, sendo que no dia do parto, observa-se a maior relação albumina/globulina (PICCIONE et al., 2011). Obviamente, tanto a albumina quanto a globulina têm reflexo no valor de proteínas totais do soro, enquanto que a ureia tem seus valores de referência relacionados com o poder de detoxificação da amônia, sendo que valores baixos desse metabólito podem ser indicativos de problemas hepáticos.

De forma categórica, Bertoni et al. (2008) demonstraram que vacas que tinham um maior índice de atividade hepática (i.e., que posteriormente seria reavaliado pelo mesmo grupo de pesquisa e determinado índice de funcionalidade hepática – LFI), apresentavam maiores valores de ureia e albumina e menores valores de haptoglobina e globulina no plasma. Já o LFI é calculado a partir dos metabólitos albumina, colesterol e bilirrubina, conforme equação sugerida por Bertoni e Trevisi (2013), sendo que valores positivos são indicativos de saúde hepática.

Ademais, quando se trata do período de transição, percebe-se que outra enzima que tem aumento expressivo na atividade seria a AST (COZZI et al., 2011). A AST, anteriormente chamada de transaminase glutâmica-oxaloacética (GOT), é encontrada principalmente no fígado, eritrócitos e nos músculos esquelético e cardíaco. Além disso, é utilizada como indicador de necrose nesses tecidos, em especial nas lesões hepáticas, pois quando há lesão essa enzima é liberada na corrente sanguínea (COZZI et al., 2011).

### 2.2.3 Metabolismo mineral

Obviamente, quando se trata de metabolismo mineral de vacas em transição, todos os macrominerais (exigidos em gramas por dia) e os microminerais (exigidos em miligramas por dia) têm importância na suplementação. No entanto, essa revisão irá abordar com maior ênfase o metabolismo do cálcio das vacas em transição.

A grande exigência de cálcio (Ca) sanguíneo para a produção de colostro pela glândula mamária associada ao baixo CMS, já destacado anteriormente, acarretam em um balanço negativo deste mineral no período pós-parto imediato.

A hipocalcemia subclínica, tradicionalmente caracterizada quando a concentração de Ca sanguíneo fica abaixo de 8,0 mg/dL (REINHARDT et al., 2011), causa redução na ingestão de alimentos, menor motilidade ruminal e intestinal e decréscimo no volume de leite produzido. Além disso, a hipocalcemia está relacionada ao aumento na suscetibilidade a outras doenças metabólicas e infecciosas (e.g., retenção de placenta, metrite, deslocamento de abomaso, cetose e mastite) pela diminuição da ativação das células do sistema imune inato, ou seja, a primeira linha de defesa do organismo (REINHARDT et al., 2011). A ocorrência de hipocalcemia é influenciada por fatores como idade, raça e potencial produtivo. Quanto a idade, já está bem estabelecido na literatura (REINHARDT et al., 2011) que animais com duas ou mais lactações têm maior risco de desenvolver esse distúrbio metabólico. Em termos raciais, vacas Jersey têm maior incidência do que vacas Holandesas. E ainda, vacas e rebanhos mais produtivos estão sob maior risco de apresentarem esta desordem.

A hipocalcemia afeta vacas leiteiras entre 48 a +72 horas em relação ao parto, com maior ocorrência nas primeiras 24 horas pós-parto, sendo provocada por um súbito desequilíbrio na regulação de Ca no sangue e podendo apresentar-se sob a forma clínica e subclínica (ORTOLANI, 1995).

A hipocalcemia subclínica tem uma incidência maior que a clínica, sendo da ordem de aproximadamente 50% nos Estados Unidos (GOFF, 2008), 30 a 40% em sistema a pasto na Nova Zelândia (ROCHE et al., 2003), e no Brasil, Carneiro et al. (2017) relataram incidência de 40% de hipocalcemia subclínica em dois grandes rebanhos confinados na região Sul do Brasil.

Como método eficiente para reduzir a incidência de hipocalcemia em vacas leiteiras, tem-se recomendado a utilização de dietas com diferença catiônica-aniônica na dieta (DCAD) negativa no pré-parto. As recomendações recentes de DCAD na dieta pré-parto variam de -5 a -15 mEq/100 g MS (OETZEL, 2013). O DCAD é alcançado basicamente reduzindo os cátions  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  e aumentando os ânions  $\text{Cl}^-$  e  $\text{S}^{2-}$ . O DCAD negativo ocasiona uma ligeira acidose metabólica no organismo, proporcionando ativação do paratormônio, o qual tem por função estimular a atividade osteoclástica, retirando o cálcio ósseo (i.e., onde se encontram cerca de 99% das reservas de Ca no organismo) e as disponibilizando no sangue (HENRY, 1995).

A redução de DCAD da dieta tem se mostrado uma ferramenta eficiente contra a ocorrência de hipocalcemia em rebanhos comerciais. Dados de meta-análise recentemente publicada (LEAN et al., 2019) mostram que, em um total de 58 comparações advindas de 31 experimentos, tendo o grupo controle consumindo média de + 2,28 mEq/100 g MS e o grupo tratado (DCAD reduzido) um consumo de -0,64 mEq/100 g MS, há uma redução do risco de hipocalcemia, retenção de placenta, metrite e do conjunto de doenças como um todo.

Todavia, dietas com DCAD demasiadamente negativas podem impactar desfavoravelmente o CMS, como foi demonstrado por Lopera et al. (2018). Os autores observaram uma redução de aproximadamente 1 kg no CMS diário quando o DCAD da dieta foi reduzido de -70 para -180 mEq/kg de MS. O DCAD em níveis mais elevados pode amplificar a acidose metabólica gerando desconforto ao animal devido a alterações ácido-básicas, modulando principalmente o aumento no intervalo das refeições (ZIMPEL et al., 2018).

#### 2.2.4 Inflamação, estresse oxidativo e efeitos sobre o sistema imune durante o período de transição

Durante o período de transição há a ocorrência de dois fenômenos inter-relacionados com a cascata metabólica descrita anteriormente: inflamação e estresse oxidativo. A inflamação é entendida como uma resposta para auxiliar o organismo a superar estímulos adversos, como um agente infeccioso ou uma lesão tecidual, com o objetivo de retornar a homeostase (BRADFORD et al., 2015). Já o estresse oxidativo pode ser entendido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a de substâncias antioxidantes (e.g., vitamina E, caroteno, taurina, glutathione peroxidase, e outros), e com isto há excesso de ROS. Este excesso de ROS gera um grande dano tecidual, sobretudo nas células do sistema imune (SORDILLO e AITKEN, 2009; SORDILLO, 2016).

Além dos clássicos sinais inflamatórios de rubor, calor, inchaço e dor, a resposta inflamatória aguda tem por função ativar mediadores, a exemplo das citocinas (e.g., fator de necrose tumoral alfa – FNT $\alpha$ ; interleucina 6 – IL-6), moléculas de adesão (e.g., L-selectina) e proteínas do sistema complemento (i.e., proteínas para amplificar a função bactericida). A ação de tais mediadores

tem por consequência a ativação de respostas sistêmicas, como por exemplo, o aumento da taxa cardíaca, a elevação da temperatura corporal e a diminuição do CMS (SORDILLO e MAVANGIRA, 2014; BRADFORD et al., 2015).

Embora seja um aspecto positivo do metabolismo, a inflamação crônica (sub-aguda) pode ser deletéria, pois pode acarretar em mudanças progressivas na função dos tecidos de certa forma contribuindo para a ocorrência de doenças (BRADFORD et al., 2015). Um exemplo clássico é quando uma vaca apresenta um excesso de lipomobilização, o qual resulta em aumento na expressão de FNT $\alpha$ , implicando em aumento do status inflamatório e da resistência à insulina, o que amplifica a lipomobilização, gerando o processo de estresse metabólico (SORDILLO e RAPHAEL, 2013).

Como consequência desse quadro metabólico tem-se um impacto direto sobre a capacidade imune. Por exemplo, o alto nível de cortisol implicará em redução das moléculas de adesão. O AGNE e o BHB elevados, por sua vez, aumentarão a toxicidade sobre as células do sistema imune, além de alteração em suas membranas. A lipólise em excesso, ou seja, grande perda de ECC, aumentará o estresse oxidativo, o que implicará no aumento da condição inflamatória, podendo ser crônica, com níveis elevados de proteínas pró-inflamatórias, como a haptoglobina (SORDILLO, 2016; TREVISI e MINUTI, 2018).

Os excessos de AGNE e BHB podem predispor a ocorrência de doenças metabólicas na forma clínica, além de implicar em prejuízos à conformação das células de defesa do organismo e a capacidade imune como um todo (Tabela 2), predispondo a ocorrência de outras enfermidades comuns do período pós-parto imediato, como retenção de placenta, deslocamento de abomaso e hipocalcemia (McART et al., 2013; OSORIO et al., 2013; SORDILLO, 2016).

É importante salientar que tais doenças são inter-relacionadas, uma vez que a ocorrência de uma delas aumenta a probabilidade de ocorrência de outra. Vale ressaltar que com o aumento na frequência de problemas metabólicos há um impacto direto sobre o ciclo lactacional, com a redução da produção leiteira, dos índices reprodutivos e da viabilidade econômica da atividade (SORDILLO, 2016).

**Tabela 2.** Efeito da variação dos parâmetros metabólicos no período de transição sobre as células do sistema imune de vacas leiteiras.

<b>Parâmetro</b>	<b>Impacto sobre o sistema imune</b>
Cortisol elevado	Redução de moléculas de adesão
Glicose reduzida	Diminuição do glicogênio intracelular
Cálcio reduzido	Diminuição da ativação celular
AGNE elevado	Alteração da membrana celular
BHB elevado	Aumento da toxicidade celular
IGF-1 reduzido	Diminuição da proliferação e diferenciação de células
Lipólise	Aumento de espécies reativas ao oxigênio (ROS)

Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de Sordillo e Raphael (2013), Sordillo e Mavangira (2014) e Sordillo (2016).

Tendo em vista esse cenário, a nutrição de vacas leiteiras busca por alternativas para que os processos deletérios comuns durante esse período sejam minimizados no organismo desses animais, com vistas a garantir uma melhor saúde e produção (ROCHE et al., 2013; SORDILLO, 2016).

#### 2.2.5 Amplitude de funções da metionina e importância da suplementação

Uma das alternativas para minimizar os efeitos deletérios desses processos supracitados é a suplementação com aminoácidos, a exemplo da metionina (MET). Dados de Wu (2009) mostram que a metionina pode ser definida como uma molécula funcional por participar e regular vias metabólicas principais para aprimorar saúde, sobrevivência, crescimento, desenvolvimento, lactação e reprodução. Por exemplo, a suplementação de metionina consistentemente aumenta as concentrações de glutatona no fígado, a qual atua como antioxidante intracelular, melhorando a função hepática e reduzindo o estresse oxidativo e a condição inflamatória.

Por definição, a metionina é considerada um aminoácido essencial e ao mesmo tempo limitante para vacas leiteiras (NRC, 2001). A metionina é advinda da dieta ou do catabolismo do tecido animal e a partir disso pode assumir diferentes caminhos dependendo, sobretudo, da condição fisiológica do animal. Existem duas vias de síntese de metionina: a transulfuração, que utiliza cisteína

como fonte de enxofre, e a sulfidrilção direta, que utiliza enxofre inorgânico como fonte de enxofre (VAN DER DRIFT et al., 2012).

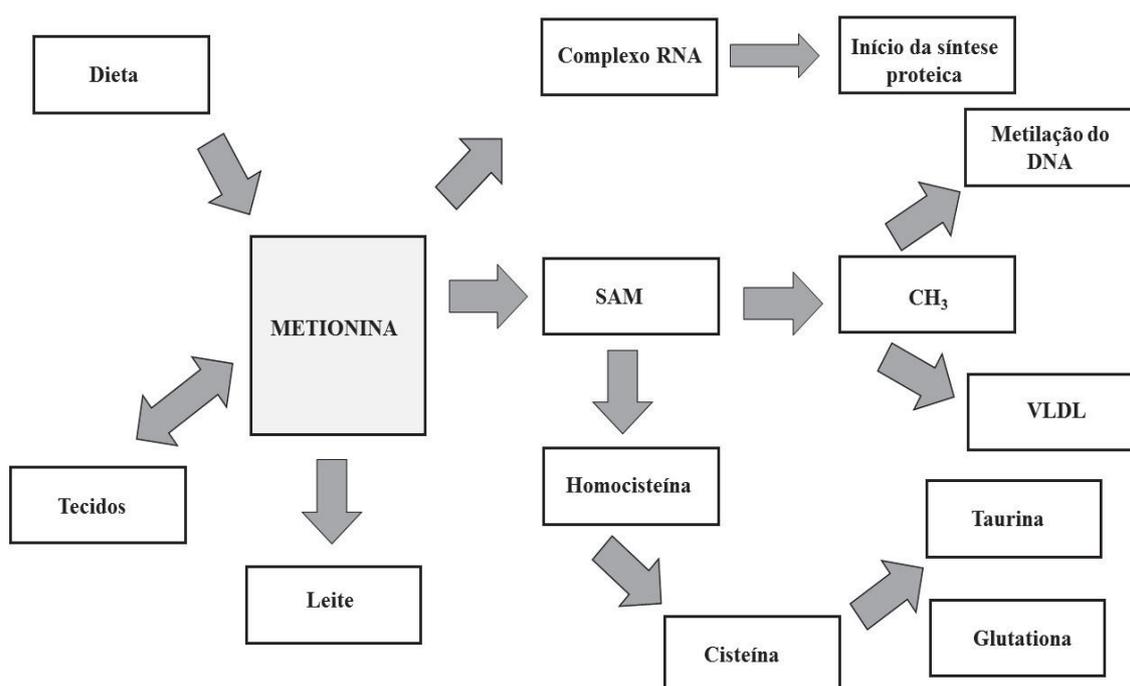
A metionina pode também ser biotransformada em sua forma doadora ativa de grupos metil ( $\text{CH}_3$ ), a S-Adenosilmetionina (SAM), que por sua vez consegue transferir tal grupamento para outros compostos como, por exemplo, na formação do VLDL e metilação do DNA (OSORIO et al., 2013). Embora isto não seja um consenso na literatura (OSORIO et al., 2014b), observa-se que pode de fato se obter algum grau de metilação do DNA, influenciando inclusive no metabolismo lipídico de embriões de vacas suplementadas com metionina no período de transição (ACOSTA et al., 2016). A formação do VLDL tende a ser menos pronunciada, não apresentando efeitos comprovados na literatura (OSORIO et al., 2014a; OSORIO et al., 2014b). Além disto, a SAM pode realizar uma biotransformação na homocisteína, a qual é precursora de duas substâncias antioxidantes: a glutatona e a taurina. Isto por sua vez acaba gerando um aumento na produção de enzimas antioxidantes (CHANDLER e WHITE, 2017).

Vale ressaltar que durante o período de transição as vacas também entram em um balanço negativo de doadores metil, a exemplo de metionina, betaína e ácido fólico, compostos de vital importância para o animal, pois são essenciais para a síntese de fosfatidilcolina e colina, que são metabólitos intermediários do metabolismo energético (ZHOU et al., 2016a). Esses doadores de grupo metil são oriundos de degradação de proteína para que seus aminoácidos sejam utilizados como precursores gliconeogênicos (VAN DER DRIFT et al., 2012).

Além disto, durante o período peri-parto há um pronunciado decréscimo na quantidade de metionina plasmática entre os dias -21 e +10 relativos ao parto (ZHOU et al. 2016a). Isto poderia acarretar inclusive em uma limitação para o desenvolvimento fetal, haja visto que o terço final da gestação é responsável por grande parte do crescimento do feto. Além disto, há comprovação que a metionina quando suplementada às vacas durante a transição pode provocar efeitos metabólicos em sua prole (JACOMETO et al., 2017).

Outro principal destino da metionina é para a formação da proteína do leite. Diversos estudos (OSORIO et al., 2013; ZHOU et al., 2016a) comprovaram o aumento da proteína do leite com a suplementação de metionina protegida

para vacas em lactação. De fato, espera-se uma resposta positiva no teor e na produção de proteína no leite ao maior suprimento dietético de metionina metabolizável. Entretanto, em muitos casos, a resposta em desempenho não é consistente, uma vez que depende da dieta basal, do estágio da lactação, do tipo do suplemento de metionina utilizado, da ocorrência de outros nutrientes limitantes, entre outros (PATTON, 2010). Uma sumarização dos efeitos da metionina no organismo de vacas leiteiras está demonstrada na Figura 3.



**Figura 3.** Amplitude de funções da metionina no organismo de vacas leiteiras. Fonte: Elaborado pelo autor.

Como fontes de metionina exógena para suplementação, existem basicamente três fontes. O primeiro é a metionina análoga HMB ou HMTBa (ácido 2-hidroxi-4-metiltio-butírico), onde há um processo de biotransformação por parte dos microrganismos do rúmen, onde há a produção de metionina. O segundo é a metionina análoga HBMi, que seria o éster isopropílico de HMB, o qual foi criado para aumentar a sua proteção e garantir maiores níveis de metionina metabolizável. Como principais exemplos de produtos comerciais a base de metionina análoga, pode-se citar o Alimet ou MFP (HMB da Novus, Estados Unidos) e o Metasmart (HMBi da Adisseo, França). E finalmente, existe a metionina protegida ruminalmente, que é revestida por encapsulamento, sendo

absorvida somente no tecido intestinal, tendo, portanto, uma maior quantidade de metionina metabolizável (OSORIO et al., 2013).

De acordo com o NRC (2001), os métodos para a proteção de aminoácidos incluem: 1) revestimento com ácidos graxos juntamente com um polímero (a exemplo do 2-vinilpiridina-co-estireno) pH sensível; e 2) revestimento ou matrizes envolvendo ácidos graxos com minerais e/ou carboidratos.

Com relação ao primeiro tipo de revestimento, há grandes vantagens de seu uso, uma vez que o polímero aparentemente altera o padrão químico do ácido esteárico, que geralmente é o ácido graxo saturado que é utilizado nestas misturas protetoras, o que confere uma maior resistência a degradação ruminal por parte do revestimento. Além disto, o polímero permite uma solubilização do produto em baixos níveis de pH, permitindo, portanto, uma liberação rápida no abomaso (SCHWAB, 2007). Tratando-se de metionina protegida ruminalmente (MPR), o principal exemplo de produto com este revestimento seria o Smartamine (Adisseo, França). Este produto possui 75% de DL-Metionina, possuindo uma biodisponibilidade de 80% (OSORIO et al., 2013).

Por outro lado, o segundo método de proteção se baseia no envolvimento da etil celulose, um carboidrato de baixa digestão devido a uma digestão enzimática mínima (SCHWAB, 2007). A degradação do produto ocorre, portanto, através de ação física, garantindo uma liberação lenta do aminoácido no intestino. Em relação a MPR, o principal exemplo de produto com este revestimento seria o Mepron (Evonik, Alemanha). Este produto possui 85% de DL-Metionina, possuindo uma biodisponibilidade de 90%.

Na avaliação da efetividade da proteção é contrastado a biodisponibilidade e há três métodos que podem ser realizados: abordagem fatorial, abordagens de respostas sanguíneas e respostas produtivas (SCHWAB, 2007). A abordagem fatorial consiste em avaliar independentemente a taxa de escape ruminal e o desaparecimento intestinal do aminoácido. O processo é feito com animais canulados e o uso de técnicas “in situ” (SCHWAB, 2007).

Abordagens de respostas sanguíneas, por outro lado, são mais fáceis de conduzir na avaliação da biodisponibilidade. Basicamente, a avaliação mais usual seria de mensurar as quantidades de aminoácidos no plasma, pois há relação linear entre o que é ingerido e o que é absorvido e disponibilizado na corrente sanguínea para o animal. Para tanto, pode ser realizado duas variações

desta abordagem; o primeiro método seria o uso de dose resposta, observando as diferenças no declínio das concentrações de aminoácidos no plasma em contraste com o nível de suplementação destes aminoácidos. O segundo método seria infundir uma quantidade de MET e avaliar também no plasma em diferentes tempos. Todavia, posteriormente seria necessário comparar os resultados com um controle positivo. Por exemplo, considera-se o uso de Smartamine como controle positivo em virtude da sua biodisponibilidade já comprovada de 80% (PATTON, 2010). A partir destes dados seria realizada a abordagem da “área sob a curva” (SCHWAB, 2007).

As respostas produtivas seria a avaliação de métodos indiretos (por exemplo, proteína do leite) com o uso de metionina protegida em dietas deficientes em metionina (SCHWAB, 2007). Embora não exista um consenso dentre os três métodos apresentados anteriormente, os métodos mais frequentemente empregados são as abordagens sanguíneas.

A metionina, quando fornecida durante o período de transição, tipicamente apresenta efeitos positivos em parâmetros produtivos, principalmente teores e quantidades de sólidos do leite. Mais frequentemente, há pronunciado aumento principalmente do percentual de proteína no leite (Tabela 3). Aparentemente, este é o único resultado que é consistente na literatura, independentemente da MPR utilizada (ZANTON et al., 2014).

Zhou et al. (2016a) ainda ressaltaram o efeito positivo da metionina sobre o CMS. Em comparação aos grupos controle, animais suplementados apresentaram ingestão superior tanto no período pré-parto, como no pós-parto. Tais achados são de grande relevância uma vez que um maior CMS neste período é benéfico, pois reduz a incidência de cetose e outras desordens metabólicas associadas, além de promover maior produção de leite. Aumentos no CMS e na produção de enzimas antioxidantes podem ser os principais responsáveis pelo aumento na atividade de células do sistema imune, sobretudo neutrófilos (OSORIO et al., 2013; OSORIO et al., 2014a).

**Tabela 3.** Principais resultados produtivos encontrados em literatura de vacas suplementadas com metionina no período de transição.

<b>Parâmetro</b>	<b>Controle</b>	<b>Metionina</b>	<b>Valor P</b>	<b>Autores</b>
CMSpré (kg/d)	12,2	12,3	NS	Osorio et al. (2013) <sup>1</sup>
CMSpré (kg/d)	13,2	14,3	0,02	Zhou et al. (2016a)
CMSpós (kg/d)	13,3	15,6	0,06	Osorio et al. (2013)
CMSpós (kg/d)	19,2	17,2	0,02	Zhou et al. (2016a)
CMSpós (kg/d)	18,3	18,3	NS	Kudrna et al. (2009)
Leite (kg/d)	35,7	40,0	0,08	Osorio et al. (2013)
Leite (kg/d)	40,4	42,2	0,02	Zhou et al. (2016a)
Leite (kg/d)	32,9	34,2	NS	Kudrna et al. (2009)
Gordura (%)	4,27	4,09	NS	Osorio et al. (2013)
Gordura (%)	3,74	3,72	NS	Zhou et al. (2016a)
Gordura (%)	3,54	3,45	NS	Kudrna et al. (2009)
Proteína (%)	3,04	3,19	0,05	Osorio et al. (2013)
Proteína (%)	3,14	3,32	<0,001	Zhou et al. (2016a)
Proteína (%)	3,13	3,12	NS	Kudrna et al. (2009)

<sup>1</sup>Osorio et al. (2013) = comparações somente com SMARTAMINE. CMSpré = consumo de matéria seca pré-parto; CMSpós = consumo de matéria seca pós-parto; NS = não significativo.

Por outro lado, considerando a dinâmica metabólica que a vaca está submetida durante o período periparturiente, a metionina aparentemente tem limitada influência sobre os parâmetros metabólicos (Tabela 4), embora existam trabalhos que identificaram uma plena melhoria dos processos imunes (OSORIO et al., 2013).

A inconsistência referente aos resultados obtidos pode ser justificada por uma amplitude de fatores. Primeiramente vale ressaltar que, para que o sucesso de uma nutrição com foco em aminoácidos seja alcançado, é necessário que a dieta em que está sendo incluído tais produtos esteja balanceada, sobretudo em energia e proteína, para que se tenha uma boa base nutricional.

**Tabela 4.** Principais resultados metabólicos encontrados em literatura de vacas suplementadas com metionina no período de transição

Parâmetro	Controle	Metionina	Valor P	Autores
Parâmetros Hepáticos e Inflamatórios				
Bilirrubina ( $\mu\text{mol/L}$ )	4,38	4,22	0,82	Zhou et al. (2016b)
Bilirrubina ( $\mu\text{mol/L}$ )	1,84	1,48	0,70	Osorio et al. (2014)
AST (U/L)	100,1	100,9	0,84	Zhou et al. (2016b)
AST (U/L)	98,7	86,6	0,34	Osorio et al. (2014)
Colesterol (mmol/L)	3,31	3,62	0,11	Zhou et al. (2016b)
Colesterol (mmol/L)	3,22	3,36	0,52	Osorio et al. (2014)
Albumina (g/L)	35,5	36,5	0,04	Zhou et al. (2016b)
Albumina (g/L)	35,1	35,7	0,15	Osorio et al. (2014)
Paroxonase (U/mL)	84,5	93,0	0,07	Zhou et al. (2016b)
Paroxonase (U/mL)	64,9	63,6	0,80	Osorio et al. (2014)
Haptoglobina (g/L)	0,47	0,35	0,08	Zhou et al. (2016b)
Haptoglobina (g/L)	0,36	0,31	0,32	Osorio et al. (2014)
Ureia (mmol/L)	5,73	5,89	0,28	Batistel et al. (2017)
Ureia (mmol/L)	4,87	4,87	0,97	Osorio et al. (2014)
Metabolismo Energético				
Glicose (mmol/L)	4,13	4,24	0,21	Batistel et al. (2017)
Glicose (mmol/L)	3,78	3,80	0,68	Zhou et al. (2016a)
AGNE (mmol/L)	0,71	0,63	0,08	Batistel et al. (2017)
AGNE (mmol/L)	0,61	0,62	0,87	Zhou et al. (2016a)
AGNE (mmol/L)	0,43	0,42	0,43	Osorio et al. (2013)
BHB (mmol/L)	0,88	0,92	0,66	Zhou et al. (2016a)
BHB (mmol/L)	1,10	0,97	0,75	Batistel et al. (2017)
BHB (mmol/L)	0,68	0,64	0,82	Osorio et al. (2013)

AST = aspartato aminotransferase; AGNE = ácidos graxos não esterificados; BHB =  $\beta$ -hidroxibutirato.

Pereira (2014) sumariza que para que se tenha sucesso na formulação de dietas por aminoácidos é necessário: 1) fornecer carboidratos da forma adequada; 2) atender a demanda de proteína no rúmen; 3) atender a demanda de proteína metabolizável (PM) e energia, de forma mais sincronizada possível através do auxílio de modelos nutricionais; 4) atender a exigência de lisina na

PM, buscando valores > 6,6% de Lys na PM); e 5) atender a exigência de metionina na PM, trabalhando com valores > 2,2% de Met na PM, mantendo uma relação lisina/metionina de 3:1. Por outro lado, atualmente uma melhor relação seria 2,8/1 (OSORIO et al., 2013).

A partir disto, a ineficiência no uso de aminoácidos pode ser devido a produtos com falhas na proteção ruminal (PATTON, 2010), estágio de lactação e dias de suplementação inapropriados (ZANTON et al., 2014; LEÃO et al., 2017) e presença de outros aminoácidos limitantes na dieta (GIALLONGO et al., 2016). Com relação aos produtos, nota-se a necessidade de escolher aqueles que tenham uma proteção cientificamente comprovada para que necessariamente o aminoácido não possua intensa degradação ruminal e consiga desempenhar seu papel metabólico.

Com relação a presença de outros aminoácidos limitantes, aparentemente após a metionina e lisina que seriam os mais limitantes (NRC, 2001), um terceiro aminoácido vem ganhando destaque: a histidina (GIALLONGO et al., 2016). Tais pontos vêm a encontro ao conceito de redução do teor de proteína bruta (PB) nas dietas visando reduzir a excreção de nitrogênio no ambiente, aumentar a eficiência do uso de nitrogênio e reduzir o custo por kg da dieta (CHASE et al., 2012).

Quando se adota esta linha, nota-se que é necessário se otimizar a síntese de proteína microbiana (PMic), pois do ponto de vista de perfil de AA, observa-se que esta possui altos percentuais de metionina e lisina, além de ter bastante semelhança com a caseína do leite. No entanto, o aminoácido limitante na PMic seria a histidina. Além disto, estudos recentes confirmam que em dietas em que se desafia os modelos nutricionais e se reduz o teor de proteína na dieta de vacas leiteiras, inclusive em dietas em que a proteína metabolizável é deficiente, há necessidade de suplementação de histidina (GIALLONGO et al., 2015; GIALLONGO et al., 2016).

Logo, resumindo, percebe-se que somente quando se usa um tipo de aminoácido, por vezes o insucesso pode ser advindo de um déficit de outros aminoácidos. Para tanto, nota-se que com relação ao teor de PB da dieta, as melhores respostas de MET, por exemplo, são encontradas quando o teor de PB está acima de 16% (LEÃO et al., 2017).

Ademais, deve-se considerar que a maioria dos estudos apresentados (Tabela 3 e 4) foi realizada durante períodos curtos de avaliação e não há limitada replicação em fazendas comerciais, sobretudo por se tratar de um assunto relativamente recente. Sendo assim, há poucos indícios dos efeitos da suplementação de metionina em uma maior quantidade de animais. Desta forma, existe ainda a real necessidade de se avaliar os efeitos desse aditivo sobre vacas leiteiras durante o período de transição, especialmente tratando-se de rebanhos comerciais.

### 2.3 REFERÊNCIAS

ACOSTA, D.A.V.; DENICOL, A.C.; TRIBULO, P.; RIVELLI, M.I.; SKENANDORE, C.; ZHOU, Z.; LUCHINI, D.; CORRÊA, M.N.; HANSEN, P.J.; CARDOSO, F.C. Effects of rumen-protected methionine and choline supplementation on the preimplantation embryo in Holstein Cows. **Theriogenology**, p.1-11, 2016.

ADEWUYI, A.A.; GRUYS, E.; VAN EERDENBURG, F.J.C.M. Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle: A review. **Veterinary Quarterly**, v.27, n.3, p.117-126, 2005.

ALLEN, M. S.; BRADFORD, B. J.; OBA, M. Board-invited review: the hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 3317-3334, 2009.

ANDERSON, D.E., RINGS, M. **Current veterinary therapy: food animal practice**. St.Louis, MO: Saunders Elsevier. *In*: PENN STATE EXTENSION, 2009.

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.

AZEVEDO, R.A.; COELHO, S.G. Resistência à insulina no período de transição de vacas leiteiras. **Nutritime**, v.13, n.6, p.4895-4901, 2016.

BATISTEL, F.; ARROYO, J.M.; BELLINGERI, A.; WANG, L.; SAREMI, B.; PARYS, C.; TREVISI, E.; CARDOSO, F.C.; LOOR, J.J. Ethyl-cellulose rumen-protected methionine enhances performance during the periparturient period and

early lactation in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.1-13, 2017.

BAUMAN, D.E.; CURRIE, B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of Dairy Science**, v.63, p.1514-1529, 1980.

BELL, A. L.; BURHANS, W. S.; OVERTON, T. R. Protein nutrition in late pregnancy, maternal protein reserves and lactation performance in dairy cows. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.59, p.119-126, 2000.

BELL, A. W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2820-2833, 1995.

BERTONI, G.; TREVISI, E. Use of the liver activity index and other metabolic variables in the assessment of metabolic health in dairy herds. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.29, n.2, p.413-431, 2013.

BERTONI, G.; TREVISI, E.; HAN, X.; BIONAZ, M. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.3300-3310, 2008.

BIONAZ, M.; TREVISI, E.; CALAMARI, L.; LIBRANDI, F.; FERRARI, A.; BERTONI, G. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.1740-1750, 2007.

BRADFORD, B.J.; YUAN, K.; FARNEY, J.K.; MAMEDOVA, L.K.; CARPENTER, A.J. Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.6631-6650, 2015.

BURKE, C.R.; MEIER, S.; MCDUGALL, S.; COMPTON, C.; MITCHELL, M.; ROCHE, J.R. Relationships between endometritis and metabolic state during the transition period in pasture-grazed dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.5363-5373, 2010.

CARDOSO, F.C.; LeBLANC, S.J.; MURPHY, M.R.; DRACLEY, J.K. Prepartum nutritional strategy affects reproductive performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.5859-5871, 2013.

CARNEIRO, E. W; HONORATO, S. H.; ICHIKAWA E. E.; ALMEIDA, R. Increased serum calcium in dairy cows with oral calcium formate supplementation in the postpartum period. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.87-88, 2017.

CHAGAS, L.M.; LUCY, M.C.; BACK, P.J.; BLACHE, D.; LEE, J.M.; GORE, P.J.S.; SHEAHAN, A.A. Insulin resistance in divergent strains of Holstein-Friesian dairy cows offered fresh pasture and increasing amounts of concentrate in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p.216-222, 2009.

CHANDLER, T.L.; WHITE, H.M. Choline and methionine differentially alter methyl carbon metabolism in bovine neonatal hepatocytes. **PLoS ONE**, v.12, n.2, e0171080, 2017.

CHAPINAL, N.; CARSON, M.; LEBLANC, S.J.; LESLIE, K.E.; GODDEN, S.; CAPEL, M.; SANTOS, J.E.P.; OVERTON, M.W.; DUFFIELD, T.F. The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p.1301-1309, 2012.

CHASE, L.E.; HIGGS, R.J.; VAN AMBURGH, M.E. **Feeding low crude protein rations to dairy cows – What have we learned?** Florida Ruminant Nutrition Symposium, p.32-43, 2012.

COZZI, G.; RAVAROTTO, L.; GOTTARDO, F.; STEFANI, A.L.; CONTIERO, B.; MORO, L.; BRSCIC, M.; DALVIT, P. Short communication: reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: Effects of parity, stage of lactation, and season of production. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.3895-3901, 2011.

DRACKLEY, J.K. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? **Journal of Dairy Science**, v.82, p.2259-2273, 1999.

DRACKLEY, J.K. **Physiological adaptations in transition dairy cows.** Minnesota Dairy Herd Health Conference, St. Paul, MN. University of Minnesota, St. Paul. 74-8, 2004.

DRACKLEY, J.K.; WALLACE, R.L.; GRAUGNARD, D. Visceral adipose tissue mass in nonlactating dairy cows fed diets differing in energy density. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.3420-3430, 2014.

DUFFIELD, T. F., K. D. LISSEMORE, B. W. MCBRIDE, K. E. LESLIE. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.571–580, 2009.

GIALLONGO, F.; HARPER, M.T.; OH, J.; LOPES, J.C.; LAPIERRE, H.; PATTON, R.A.; PARYSLL, C.; SHINZATO, L.; HRISTOV, A.N. Effects of rumen-protected methionine, lysine, and histidine on lactation performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.99, p.1-16, 2016.

GIALLONGO, F.; HRISTOV, A.N.; OH, J.; FREDERICK, T.; WEEKS, H.; WERNER, J.; LAPIERRE, H.; PATTON, R.A.; GEHMAN, A.; PARYSLL, C. Effects of slow-release urea and rumen-protected methionine and histidine on performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.1-17, 2015.

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

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006, 357p.

GRUMMER, R. R. **Insulin resistance in transition dairy cows: friend or foe?** Pacific Nutrition Conference. 2016.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 1995.

HERDT, T. H. Ruminant adaptation to negative energy balance influences on the etiology of ketosis and fatty liver. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.16, p.215-230, 2000.

HUSNAIN, A.; SANTOS, JEP. Meta-analysis of the effects of prepartum dietary protein on performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.102, p.9791-9813, 2019.

JACOMETO, C.B.; ZHOU, Z.; LUCHINI, D.; CORREA, M.N.; LOOR, J.J. Maternal supplementation with rumen-protected methionine increases prepartal

plasma methionine concentration and alters hepatic mRNA abundance of 1-carbon, methionine, and transsulfuration pathways in neonatal Holstein calves. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.1-11, 2017.

KALAITZAKIS, E.; PANOUSIS, N.; ROUBIES, N.; GIADINIS, N.; KALDRYMIDOU, E.; GEORGIADIS, M.; KARATZIAS, H. Clinico-pathological evaluation of downer dairy cows with fatty liver. **Canadian Veterinary Journal**, v.51, p.615-622, 2010.

KIM, I.H.; SUH, G.H.; Effect of the amount of body condition loss from the dry to near calving periods on the subsequent body condition change, occurrence of postpartum diseases, metabolic parameters and reproductive performance in Holstein dairy cows. **Theriogenology**, V.60, N.8, p.1445-56, 2003.

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

KOZLOSKI, G.V. Bioquímica dos ruminantes. 2. ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2009. 216p.

KURDNA, V.; ILLEK, J.; MAROUNEK, M.; NGOC, A.N. Feeding ruminally protected methionine to pre and postpartum dairy cows: effect on milk performance, milk composition and blood parameters. **Czech Journal of Animal Science**, v.54, n.9, p.395–402, 2009.

LEAN, I.J.; SANTOS, J.E.P.; BLOCK, E.; GOLDBERGER, H.M. Effects of prepartum dietary cation-anion difference intake on production and health of dairy cows: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v.102, p.1-31, 2019.

LEÃO, G.F.M.; DOREA, J.R.R.; DANES, M.C.A. Factors affecting performance responses to supplementation of rumen-protected methionine for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.100 (Suppl. 2), p.93-94, 2017.

LEBLANC, S. **Monitoring programs for transition dairy cows**. XXIV World Buiatrics Congress, Nice – França, 2005.

LOPERA, C., R. ZIMPEL, A. VIEIRA-NETO, F. R. LOPES, W. ORTIZ, M. POINDEXTER, B. N. FARIA, M. L. GAMBARINI, E. BLOCK, C. D. NELSON, J. E. P. SANTOS. Effects of level of dietary cation-anion difference and duration of

prepartum feeding on performance and metabolism of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.101, p.7907-7929, 2018.

MCART, J.A.A., NYDAM, D.V., OETZEL, G.R. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.5056-5066, 2012.

McART, J.A.A.; NYDAM, D.V.; OETZEL, G.R.; OVERTON, T.R.; OSPINA, P.A. Elevated non-esterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. **The Veterinary Journal**, v.198, p.560-570, 2013.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle – NRC**. Washington, D.C.: National Academy Press. 2001. 157p.

NDLOVU, T.; CHIMONYO, M.; OKOH, A.; MUCHENJE, V.; DZAMA, K.; RAATS, JG. Assessing the nutritional status of beef cattle: current practices and future prospects. **African Journal of Biotechnology**, v.6, p.2727-2734, 2007.

OETZEL, G. R. **Minimizing hypocalcemia during early lactation**. Proceedings of the Tri-State Dairy Nutrition Conference, n. 608, p. 23–34, 2013.

OETZEL, G. R. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.20, p.651-674, 2004.

ORTOLANI, E. Aspectos clínicos, epidemiológicos e terapêuticos da hipocalcemia de vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.47, p.799-808, 1995.

OSORIO, J.S; JI, P.; DRACKLEY, J.K.; LUCHINI, D.; LOOR, J.J. Smartamine M and MetaSmart supplementation during the peripartal period alter hepatic expression of gene networks in 1-carbon metabolism, inflammation, oxidative stress, and the growth hormone–insulin-like growth factor 1 axis pathways. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.7451-7464, 2014a.

OSORIO, J.S; TREVISI, E.; JI, P.; DRACKLEY, J.K.; LUCHINI, D.; BERTONI, G.; LOOR, J.J. Supplemental Smartamine M or MetaSmart during the transition period benefits postpartal cow performance and blood neutrophil function. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.6248-6263, 2013.

OSORIO, J.S.; TREVISI, E.; JI, P.; 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**, Savoy, v.97, p.7437-7450, 2014b.

OSPINA, P. A.; NYDAM, D.V.; STOKOL, T.; OVERTON, T.R. Associations of elevated nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the Northeastern United States. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.1596-1603, 2010.

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, p.2105-2118, 2010.

PEREIRA, M.N. **Suplementação de metionina para melhorar a produtividade da vaca leiteira**. Simpósio Nacional da Vaca Leiteira, p.34-51, 2014.

PICCIONE, G.; MESSINA, V.; SHEMBARI, A.; CASELLA, S.; GIANNETTO, C.; ALBERGHINA, D. Pattern of serum protein fractions in dairy cows during different stages of gestation and lactation. **Journal of Dairy Research**, v.78, p.421-425, 2011.

QUIROZ-ROCHA, G.F.; LEBLANC, S.J.; DUFFIELD, T.F.; WOOD, D.; LESLIE, K.E.; JACOBS, R.M. Reference limits for biochemical and hematological analytes of dairy cows one week before and one week after parturition. **Canadian Veterinarian Journal**, v.50, p.383-388, 2009.

REINHARDT, T.A.; LIPPOLIS, J.D.; McCLUSKEY, B.J.; GOFF, J.P.; HORST, R.L. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. **The Veterinary Journal**, v.188, p.122-124, 2011.

RICO, J.E.; BANDARU, V.V.R.; DORSKIND, J.M.; HAUGHEY, N.J.; McFADDEN, J.W. Plasma ceramides are elevated in overweight Holstein dairy cows experiencing greater lipolysis and insulin resistance during the transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.7757-7770, 2015.

ROCHE, J.R. 2003. The incidence and control of hypocalcemia in pasture-based systems. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.97, p.141-144, 2003.

ROCHE, J.R.; BELL, A.W.; OVERTON, T.R.; LOOR, J.J. Nutritional management of the transition cow in the 21st century: a paradigm shift in thinking. **Animal Production Science**, v.53, p.1000-1023, 2013.

ROCHE, J.R.; FRIGGENS, N.C.; KAY, J.K.; FISHER, M.W.; STAFFORD, K.J.; BERRY, D.P. Invited review: body condition score and its association with dairy cow productivity, health and welfare. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.5769-5801, 2009.

SCHWAB, C. G. 2007. **Protected proteins and amino acids for ruminants**. In: Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding, p.115-141. Wiley-VCH Verlag GmbH.

SEIFI, H.A., MIRSHOKRAIE, P., FARZANEH, N. Metabolic profile test in Iran: variations of metabolites around parturition at dairy cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.44 (Suppl. 1):p.1213, 2003.

SORDILLO, L. M.; RAPHAEL, W. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.29, p.267-278, 2013.

SORDILLO, L.M. Nutritional Strategies to optimize dairy cattle immunity. **Journal of Dairy Science**, v.99, p.4967-4982, 2016.

SORDILLO, L.M.; AITKEN, S.L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, p.104-109, 2009.

SORDILLO, L.M.; MAVANGIRA, V. The nexus between nutrient metabolism, oxidative stress and inflammation in transition cows. **Animal Production Science**, v.54, n.9, p.1204-1214, 2014.

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

TAO, S.; BUBOLZ, J.W.; DO AMARAL, B.C.; THOMPSON, I.M.; HAYEN, M.J.; JOHNSON, S.E.; DAHL, G.E. Effect of heat stress during the dry period on

mammary gland development. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.5976-5986, 2011.

TAO, S.; DAHL, G. E. Invited review: heat stress effects during late gestation on dry cows and their calves. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.1-15, 2013.

TENNANT, B.C.; CENTER, S.A. **Hepatic function**, p.379-412. In: Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. (Eds), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6<sup>a</sup> ed. Academic Press, Burlington, 2008.

TREVISI, E.; MINUTI, A. Assessment of the innate immune response in the periparturient cow. **Research in Veterinary Science**, v.116, p.47-54, 2018.

VAN DER DRIFT, S.G.A.; HOUEWLING, M.; SHONEWILLE, J.T.; TIELENS, A.G.M. JORRITSMA, R. Protein and fat mobilization and associations with serum Beta-hydroxybutyrate concentrations in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.4911-4920, 2012.

WHITE, H.M. The role of TCA cycle anaplerosis in ketosis and fatty liver in periparturient dairy cows. **Animals**, v.5, p.793–780, 2015.

WU, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, v.37, p.1-17, 2009.

ZANTON, G.I.; BOWMAN, G.R.; VAZQUEZ-AÑÓN, M.; 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**, v.97, p.7085-7101, 2014.

ZENOBI, M.G., GARDINAL, R., ZUNIGA, J.E. Effects of supplementation with ruminally protected choline on performance of multiparous Holstein cows did not depend upon prepartum caloric intake. **Journal of Dairy Science**, v.101, p.1-23, 2018.

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, p.8956-8969, 2016b.

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, p.1-17, 2016a.

ZIMPEL, C.; POINTDEXTER, M.B.; VIEIRA-NETO, A.; et al. Effect of dietary cation-anion difference on acid-base status and dry matter intake in dry pregnant cows. **Journal of Dairy Science**, v.101, p.8461-8475, 2018.

### **3 CAPÍTULO II: SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA E SEUS EFEITOS NOS ASPECTOS PRODUTIVOS E METABÓLICOS DE VACAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO**

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

O leite é um dos principais produtos do agronegócio nacional. Todavia, na cadeia de produção de leite brasileira, ainda há grande heterogeneidade de sistemas produtivos e baixa produtividade por animal. Com isto, existe a necessidade latente de intensificação em diversos pontos da produção, sendo que a alimentação tem local de destaque por constituir o setor mais oneroso em termos financeiros, podendo representar até 60% dos custos totais de produção (COSTA e BREZOLIN, 2014).

De uma forma geral, além de se otimizar formulação e manejo nutricional, outro tópico que ganha notoriedade atualmente é o uso de aditivos nutricionais ou o uso em doses mais elevadas de nutrientes específicos, com vistas a melhorar o potencial produtivo e metabólico dos animais, visando ainda redução de doenças, de descarte e aumento da longevidade.

Estudos conduzidos ao longo desta última década vêm demonstrando resultados promissores da suplementação de aditivos nutricionais focados em buscar benefícios além da esfera produtiva, sendo utilizados para melhoria de saúde, sobretudo em períodos de alto desafio metabólico, a exemplo do que ocorre no período de transição (OSORIO et al., 2013; OSORIO et al., 2014a; OSORIO et al., 2014b; SORDILLO, 2016).

O período de transição é definido como as três semanas anteriores e as três semanas posteriores em relação ao parto. Obviamente, é um período de alta demanda, pois ocorrem intensas mudanças metabólicas e hormonais que acabam tendo impacto sobre toda a lactação (DRACKLEY, 1999). Tais mudanças implicam em uma maior incidência de doenças, que conseqüentemente impactam no potencial aumento do descarte involuntário (BURKE et al., 2010; ROCHE et al., 2013).

Além do desbalanço que ocorre no metabolismo energético e proteico, há redução na produção de doadores de grupo metil, a exemplo de metionina, betaína e ácido fólico, compostos de vital importância para o animal. Tais

compostos são essenciais para a síntese de fosfatidilcolina e colina, que são metabólitos intermediários do metabolismo energético (ZHOU et al., 2016a).

Uma das alternativas para minimizar estes processos supracitados é a suplementação com metionina protegida ruminalmente (MPR). Este aminoácido sulfurado é considerado limitante e essencial, pois tem papel de destaque pela sua grande amplitude de funções no organismo animal (OSORIO et al., 2013).

Embora tenha resultados extremamente promissores, ainda não há consenso na literatura disponível, das respostas produtivas e metabólicas deste aditivo no período de transição. Sendo assim, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de MPR sobre o desempenho produtivo e aspectos metabólicos de vacas leiteiras periparturientes em um rebanho comercial.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido em um rebanho comercial pertencente à Fazenda Frank'Anna, localizada em Carambeí, região centro-oriental do Estado do Paraná, Brasil. Foram suplementados e monitorados 166 animais da raça Holandesa, sendo 108 multíparas, com média de  $2,6 \pm 0,8$  lactações, e 58 primíparas, todos avaliados durante o período de transição, e blocados de acordo com a ordem de parto e a data prevista de parto. Os animais foram alocados em currais pré-parto, cama modelo Compost Barn, sendo a cama revolvida diariamente, possuindo cochos com canzil e bebedouros. O espaço médio de cocho para os animais foi de 0,80 m/animal e houve separação entre novilhas e vacas. O período experimental foi de 22 de maio de 2017 até 29 de setembro de 2017. O protocolo do Comissão de Ética no Uso de Animais foi aprovado sob o número 053/2016 (Apêndice 5.1).

Os tratamentos foram os seguintes: Controle – dieta controle sem suplementação e Metionina – dieta controle com suplementação de metionina protegida ruminalmente (Smartamine<sup>®</sup>, Adisseo Inc), na inclusão de 8 g/animal/dia no período pré-parto e de 15 g/animal/dia no período pós-parto. A justificativa para a utilização de duas doses distintas do produto advém da necessidade de se manter uma relação Lisina: Metionina de 2,8:1, conforme demonstrado por Osorio et al. (2013). A quantidade de metionina e lisina

metabolizável, em gramas, preditas através do software do NRC (2001), foram de 24,5 e 70g no pré-parto e de 74 e 222g no pós-parto, respectivamente.

A metionina protegida avaliada (Smartamine®; Adisseo Inc) tem uma proporção de 80% de metionina verdadeira, fisicamente revestida com biodisponibilidade de 80%. O uso da metionina nas dietas experimentais coincidiu com o início do período de transição (21 dias antes da data prevista do parto) e se prolongou em média até o 16º dia de lactação (data de saída dos animais do lote pós-parto, conforme manejo da fazenda). Após a saída do lote pós-parto, por decisão de manejo da própria fazenda, todos os animais foram suplementados com MPR. Portanto, o período médio de suplementação foi de 38 dias, sendo 22 dias no pré-parto e 16 dias no pós-parto.

### 3.2.1 Dietas experimentais

Os animais foram alimentados com as dietas experimentais, formuladas de acordo com as exigências de manutenção, gestação e lactação para o período pré e pós-parto (Tabelas 1 e 2). As exigências preditas e as dietas foram formuladas através do software do NRC (2001). As dietas foram formuladas para uma produção de 42 litros, gordura do leite de 3,5% e proteína do leite de 3,3%.

Previamente à formulação das dietas, foram realizadas análises bromatológicas dos alimentos volumosos da fazenda, sendo feitas análises da dieta total misturada (DTM) e ajustes semanais de acordo com as mudanças nutricionais principalmente nos alimentos volumosos. Seguindo o manejo usual da fazenda, os animais eram alimentados três vezes ao dia no pré-parto e cinco vezes ao dia no pós-parto, na forma de DTM, sendo permitidas sobras de 10% do fornecido.

**Tabela 1.** Dietas experimentais nos períodos pré-parto e pós-parto formuladas a partir das exigências do NRC (2001)

Alimento (% da Matéria Seca)	Pré-Parto		Pós-Parto	
	Controle	Metionina	Controle	Metionina
Silagem de milho de planta inteira	50,55	50,54	32,39	32,39
Palha de trigo	25,09	25,07	—	—
Silagem pré-secada de azevém	—	—	7,41	7,41
Farelo de soja	8,09	8,07	11,33	11,33
Milho moído fino	5,64	5,62	13,93	13,92
Casca de soja	—	—	4,07	4,06
Caroço de algodão	—	—	5,04	5,03
Farelo de trigo	—	—	1,60	1,60
DDGS	8,09	8,07	4,99	4,99
Resíduo de cervejaria	—	—	4,88	4,88
Farelo do resíduo de milho	—	—	11,22	11,22
Óleo vegetal	—	—	0,09	0,09
Gordura protegida	—	—	0,67	0,67
Óxido de magnésio	—	—	0,30	0,30
Sal branco	—	—	0,21	0,21
Calcário	—	—	0,72	0,72
Bicarbonato de sódio	—	—	0,85	0,85
Adsorvente de micotoxinas	0,09	0,09	—	—
Premix vitamínico-mineral pré-parto	2,64	2,64	—	—
Premix vitamínico-mineral lactação	—	—	0,30	0,30
Metionina Protegida	—	0,08	—	0,04

DDGS: Resíduo de destilaria de milho

As amostras dos alimentos eram coletadas semanalmente foram secas em estufa de circulação forçada a 55°C e moídas a 1 mm em moinho tipo "Willey", onde sequencialmente determinou-se a matéria seca (MS) total em estufa a 105°C por 16 horas (SILVA e QUEIROZ, 2009), proteína bruta (PB) pelo método micro Kjeldahl e resíduo mineral (RM) por incineração a 550°C, por 4 horas. Foram determinados ainda os teores de fibra em detergente neutro (FDN), conforme Van Soest et al. (1991), utilizando-se  $\alpha$ -amilase termoestável (Termamyl 120L, Novozymes Latin América Ltda.), e fibra em detergente ácido (FDA), segundo Goering e Van Soest (1970). Extrato etéreo seguiu as recomendações de Silva e Queiroz (2009). As análises foram conduzidas no Laboratório de Nutrição Animal da UFPR, em Curitiba, Paraná. Os resultados médios das análises de volumosos encontram-se na Tabela 3.

**Tabela 2.** Composição nutricional das dietas experimentais nos períodos pré-parto e pós-parto formuladas a partir das exigências do NRC (2001)

Nutrientes	Pré-Parto		Pós-Parto	
	Controle	Metionina	Controle	Metionina
MS (% da MN)	44,9	44,9	47,0	47,0
FDN (% da MS)	40,50	40,50	31,90	31,90
PB (% da MS)	13,23	13,25	17,40	17,40
PDR (% da MS)	10,60	10,50	11,50	11,50
PNDR (% da MS)	2,63	2,75	5,90	5,90
Lisina (% da PM)	6,78	6,77	6,90	6,90
Metionina (% da PM)	2,03	2,35	1,97	2,46
Lisina/Metionina	3,33:1	2,88:1	3,50:1	2,80:1
EE (% da MS)	3,93	3,93	5,10	5,10
DCAD (mEq/kg MS)	-76	-76	+233	+233
Cálcio (% da MS)	0,64	0,64	0,60	0,60
Fósforo (% da MS)	0,44	0,44	0,40	0,40
Magnésio (% da MS)	0,25	0,25	0,42	0,42
Potássio (% da MS)	1,29	1,29	1,16	1,16
Sódio (% da MS)	0,17	0,17	0,35	0,35
Vitamina A (KUI kg/MS)	10,50	10,50	23,9	23,9
Vitamina D (KUI/kg MS)	2,60	2,60	6,0	6,0
Vitamina E (UI/kg MS)	208	208	149	149

MS: Matéria Seca; MN: Matéria Natural; FDN: Fibra em Detergente Neutro; PB: Proteína Bruta; PDR: Proteína Degradável no Rúmen; PNDR: Proteína Não Degradável no Rúmen; EE: Extrato Etéreo; DCAD: Diferença Cátion-Aniônica da Dieta.

**Tabela 3.** Composição nutricional dos alimentos volumosos

Nutrientes	Silagem de milho	Pré-secado de Azevém
MS (% da MN)	27,00	36,62
PB (% da MS)	7,23	15,21
FDN (% da MS)	46,95	50,81
FDA (% da MS)	21,78	28,38
Lignina (% da MS)	2,65	3,18
EE (% da MS)	3,99	5,10
RM (% da MS)	3,28	10,91

MS: Matéria Seca; MN: Matéria Natural; FDN: Fibra em Detergente Neutro; FDA: Fibra em Detergente Ácido; PB: Proteína Bruta; EE: Extrato Etéreo; RM: Resíduo Mineral.

A distribuição das dietas experimentais foi realizada às 8:30h para os animais do pré-parto e após a ordenha da manhã (7:30 h) para os animais do pós-parto. Os aditivos foram fornecidos sobre a DTM, *top-dressed*, somente no período da manhã. Após 60 dias em lactação, animais recebiam somatotropina injetável (rBST).

### 3.2.2 Avaliação do desempenho e composição do leite

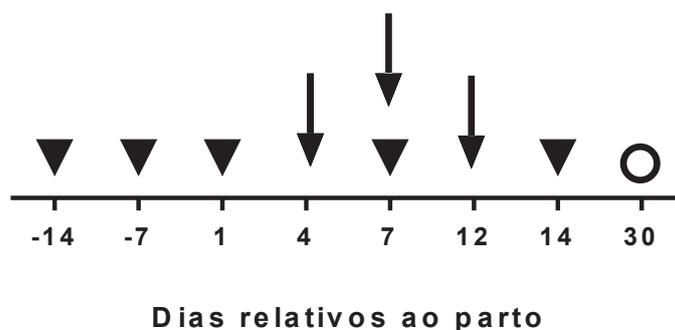
Antes e depois do parto foi realizada a pesagem dos animais através de fita graduada do perímetro torácico, para obtenção do peso vivo pré-parto (PV pré) no dia -7 relativo a data prevista do parto, peso vivo pós-parto (PV pós) no dia + 7 em relação a data efetiva do parto e a magnitude de perda de peso através da diferença entre estes pesos. Foi realizada também a determinação do escore de condição corporal (ECC), tanto no pré (ECC pré) quanto no pós-parto (ECC pós), utilizando-se da escala de 1 a 5, sendo 1 o animal excessivamente magro e 5 o animal excessivamente gordo, conforme a indicação de Edmonson et al. (1989).

No pós-parto foi avaliado o colostro e a determinação da qualidade foi realizada através do refratômetro de brix, conforme as recomendações de Quingley et al. (2013). A produção diária de leite foi determinada por meio da mensuração diária através de software integrado (Dairy Plan, GEA) até os 90 dias de lactação.

A determinação da composição do leite; teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e caseína, nitrogênio ureico no leite (NUL) e contagem de células somáticas (CCS), foram feitos na primeira e na segunda semana de lactação. Em cada ordenha foram coletados 40 mL de leite, os quais foram armazenados em potes de polietileno com um comprimido de conservante bronopol, e encaminhadas ao Laboratório Centralizado da Associação Paranaense dos Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH). No Laboratório da APCBRH, em Curitiba, Paraná, Brasil, as amostras foram analisadas para gordura, proteína, lactose, sólidos totais, contagem de células somáticas (CCS), caseína e nitrogênio ureico no equipamento Nexgen (Bentley Instruments®), através da metodologia de citometria de fluxo. Os teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e caseína também foram expressos valores absolutos (em kg), multiplicando seus teores médios pela produção média do período de suplementação (16 dias).

### 3.2.3 Perfil metabólico, sistema imunológico, transferência de imunidade passiva e incidência de doenças

Colheitas de sangue foram realizadas nos dias -14, -7, +1, +4, +7, +12, +14 e +30 relativos ao parto, durante o período da manhã, por punção da veia coccígea.



**Figura 1.** Esquema de colheitas sanguíneas para soro e plasma (▼), para fita de BHB (↓) e somente de soro (○).

As amostras foram colhidas em tubos vacuolizados (Vacutainer®) sem anticoagulante (10 mL) e com anticoagulante EDTA (6 mL), e mantidas sob refrigeração até processamento. Logo após a colheita, as amostras foram centrifugadas (10 min a 3000 rpm) para obtenção do soro e do plasma que foram armazenados em microtubos de plástico tipo eppendorf® de 2 mL (em duplicata) e congelados a -20°C (STOKOL e NYDAM, 2005).

A partir do soro, foram determinadas as concentrações de AGNE (ácidos graxos não esterificados) e BHB ( $\beta$ -hidroxibutirato), quantificadas por metodologia enzimática colorimétrica, usando reagentes padronizados comerciais da marca Randox® (kit NEFA FA115 e kit Ranbut D-3 Hidroxibutirato RB 1007). Para a análise de BHB, além da coleta mencionada acima, também foram coletadas amostras para análise da concentração sanguínea de  $\beta$ -cetonas através de tiras-teste (Precision Xtra – blood  $\beta$ -ketones test strips) no aparelho Optium Xceed, da marca Abbott Laboratories (Abbott Park, IL). As coletas foram feitas somente no pós-parto nos dias +4, +7 e +12 (Figura 1).

Também foram analisados os seguintes metabólitos: colesterol total, albumina, globulina, bilirrubina total, aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), proteínas totais, cálcio total, triglicerídeos, glicose e nitrogênio ureico. As análises foram realizadas em analisador bioquímico automático do modelo BS-200 da marca Mindray. Amostras hemolisadas foram descartadas (STOKOL & NYDAM, 2005).

A atividade sérica da paraoxonase 1 (PON) foi determinada a partir de protocolo descrito por Browne et al. (2007). A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS (Femto, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 270 nm e um tempo de leitura de 30 segundos, sendo a atividade da enzima determinada pela fórmula:  $\Delta$  absorvância x 115 x 4.

A partir dos metabólitos albumina, colesterol e bilirrubina foi calculado o Índice de Funcionalidade Hepática (Liver Functionality Index – LFI) conforme a equação sugerida por Bertoni e Trevisi (2013). O cálculo do índice é dividido basicamente em dois estágios, onde no primeiro considera-se a concentração (C) dos três parâmetros no dia +1 (D1) e no dia +30 (D30). O índice de albumina e colesterol é calculado por:  $0,5 \times D3 + 0,5 \times (D30 - D1)$ . O índice de bilirrubina é calculado por:  $0,67 \times D3 + 0,338(D30 - D1)$ . No segundo estágio, os índices de cada metabólito são incluídos em uma nova fórmula:  $LFI = [(\text{Índice Albumina} - 17,71)/1,08 + (\text{Índice de Colesterol} - 2,57)/0,43 - (\text{Índice de Bilirrubina} - 6,08)/2,17]$ . Vacas com LFI positivo é indicativo de saúde hepática.

A partir do plasma foram dosados os aminoácidos plasmáticos (plasma EDTA) no laboratório pertencente ao Departamento de Ciências Leiteiras da Universidade de Wisconsin, em Madison, EUA. As demais análises bioquímicas supracitadas foram conduzidas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR e no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPEl).

Durante os primeiros 60 dias pós-parto foram verificadas as incidências das seguintes enfermidades: cetose clínica e subclínica, retenção de placenta, hipocalcemia clínica e subclínica, deslocamento de abomaso, mastite clínica e subclínica e metrites clínicas. Morbidade foi avaliada pela presença de uma ou de duas ou mais doenças. Para a verificação de cetose subclínica foi considerada concentração de BHB  $\geq 1,2$  mmol/L, conforme a indicação de McArt et al. (2012). Para a hipocalcemia subclínica foi considerada uma concentração limiar de cálcio sérico  $< 2,0$  mmol/L ( $< 8,0$  mg/dL), conforme Reinhardt et al. (2011). Já para a verificação da incidência de mastite subclínica foi levado em consideração o valor de CCS acima de 200.000 células/mL como valor referência de acordo com a indicação de Sharma et al. (2011).

### 3.2.4 Índices reprodutivos e descarte

Os parâmetros reprodutivos avaliados foram: taxa de prenhez, prenhez aos 60, 120 e 150 dias (confirmados por ultrassom), dias abertos (número de dias entre o parto e a concepção ou período de serviço) e número de inseminações por concepção. Além disto, foi avaliado o descarte nos primeiros 60 dias e também o descarte total durante toda a lactação. Todos os dados foram obtidos através de anotações advindas do rebanho.

### 3.2.5 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental empregado foi o de blocos ao acaso. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e comparados utilizando o teste de Tukey ao nível de 5% de significância por intermédio do procedimento GLM e quando haviam medidas repetidas no tempo, optou-se pelo procedimento MIXED do programa SAS (2002). Já para a avaliação de incidência de doenças e parâmetros reprodutivos, os dados foram avaliados pelo procedimento GLIMMIX do SAS (2002). O modelo matemático utilizado para a análise de variância foi:

$$Y_{ijklm} = \mu + A_i + P_j + AP_{ij} + C_{ijkl} + T_m + DT_{im} + DPT_{ijm} + e_{ijklm}, \text{ onde:}$$

$Y_{ijklm}$  = Variáveis dependentes ij;

$\mu$  = média geral dos tratamentos;

$A_i$  = efeito do tratamento com MPR  $i$ ,  $i = 1...2$ ;

$P_j$  = efeito da ordem de parição  $k$ ,  $k=1$  para primíparas e 2 para multíparas;

$AP_{ij}$  = efeito da interação entre a "i" presença de MPR e a "j" ordem de parição;

$C_{ijl}$  = efeito aleatório da "l" vaca dentro do "i" tratamento dentro da "j" ordem de parição; A estrutura de covariância utilizada foi a não estruturada.

$T_m$  = efeito do tempo (dias ou semanas).

$DT_{im}$  = efeito de interação entre presença de MPR e tempo;

$DPT_{ijm}$  = efeito de interação entre presença de MPR, ordem de parição e tempo;

$e_{ijklm}$  = erro do resíduo.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode ser observado na Tabela 4 que, indiferentemente do período avaliado durante o início da lactação, a produção de leite não apresentou diferença entre os tratamentos avaliados. Nota-se inclusive, que a produção de leite média nos primeiros 16 e 30 dias, a qual pode ser reflexo sobretudo do período de transição, foi similar ( $P=0,80$  e  $P=0,83$ , respectivamente) entre os animais suplementados com MPR e controle. Tais resultados estão em consonância com os achados de Kurdna et al. (2009), que também não observaram diferença significativa entre animais suplementados ou não com MPR.

Em contraponto, Osorio et al. (2013) e Zhou et al. (2016a) encontraram diferenças significativas na ordem de 12% e 5,5%, respectivamente, na produção de leite a favor dos animais suplementados com MPR. Tais achados podem estar respaldados no fato que, nestes trabalhos, foi observado aumento significativo no consumo de matéria seca (CMS) no período pós-parto (2,3 e 2,0 kg de MS, respectivamente).

Todavia, estes resultados não são um consenso. Por exemplo, Ordway et al. (2009), avaliando os efeitos de MPR para vacas Holandesas periparturientes, observaram um menor CMS nos animais tratados, o que implicou em redução na produção de leite. Isto também foi constatado em outros trabalhos que demonstraram que vacas consumindo Smartamine também podem apresentar menor CMS (SOCHA et al., 2005).

Desta forma, observa-se que o aumento de produção de leite no início de lactação sofre grande influência do CMS. Infelizmente, no rebanho comercial onde o presente experimento foi conduzido, a mensuração do CMS não era uma possibilidade.

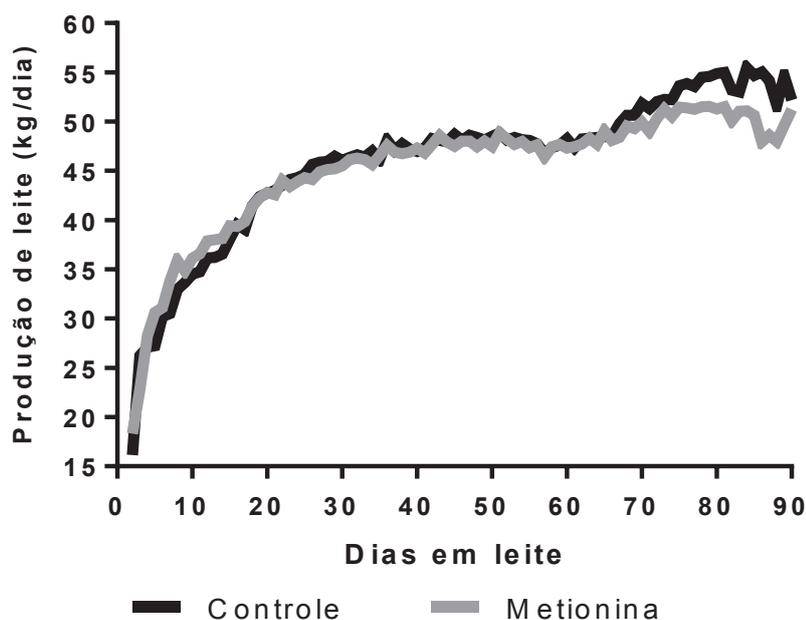
Patton (2010), através de um trabalho de meta-análise, observou que vacas Holandesas que receberam MPR produziram menor volume de leite (-0,25 kg/dia). Aparentemente, este aspecto ainda fica mais deletério quando as dietas são baseadas em silagem de milho (-0,47 kg/dia). No entanto, isto não se observou no presente estudo. Pode-se observar inclusive, uma similaridade muito grande dentro do período de suplementação (até o 16º dia em leite) e também quando todas as vacas foram suplementadas (Figura 2).

**Tabela 4.** Produção e composição do leite de vacas leiteiras suplementadas com MPR durante o período de transição

<b>Parâmetro (%)</b>	<b>Controle</b>	<b>Metionina</b>	<b>EPM</b>	<b>Valor P</b>
Produção de leite 16d	33,70	34,10	1,22	0,80
Produção de leite 30d	39,90	39,60	1,17	0,83
Produção de leite 60d	43,10	42,90	1,14	0,87
Produção de leite 90d	44,90	44,50	1,18	0,78
Produção de leite 10-40d	42,20	41,80	1,16	0,82
Produção acumulada 10-40d	1201	1171	33,0	0,51
Produção de leite corrigido para energia	27,20	27,90	0,89	0,47
Gordura (%)	4,07	4,40	0,12	0,07
Proteína (%)	3,38	3,46	0,04	0,20
Lactose (%)	4,43	4,47	0,04	0,48
Caseína (%)	2,65	2,73	0,04	0,19
Gordura (kg/d)	1,41	1,49	0,06	0,50
Proteína (kg/d)	1,20	1,23	0,05	0,65
Lactose (kg/d)	1,49	1,50	0,05	0,99
Caseína (kg/d)	0,97	0,99	0,05	0,74
Relação GP1C <sup>1</sup>	1,18	1,24	0,03	0,23
Relação caseína/proteína	0,78	0,79	0,02	0,46
Sólidos totais (%)	13,36	13,63	0,16	0,26
Nitrogênio ureico (mg/dL)	13,34	13,66	0,52	0,67
Escore linear de células somáticas	3,6	4,1	0,22	0,08
Colostro (% Brix)	25,6	26,4	0,48	0,27

<sup>1</sup>Relação gordura/proteína no primeiro controle.

Com relação a composição do leite, os teores de gordura tenderam ( $P=0,07$ ) a ser mais altos nos animais suplementados com MPR. Os demais contrastes para sólidos não obtiveram ( $P>0,10$ ) resultados significativos. Embora alguns estudos demonstraram que a MPR não influencia o teor de gordura do leite (KUDRNA et al., 2009; OSORIO et al., 2013; ZHOU et al., 2016a), os resultados aqui apresentados se assemelham aos dados publicados com vacas em período de transição (SOCHA et al., 2005; MICHELOTTI et al., 2018) e com vacas no início de lactação (CHIOGNA JUNIOR et al., 2019).



**Figura 2.** Avaliação da curva de lactação nos primeiros 90 dias de lactação em vacas suplementadas com MPR durante o período de transição.

Resumidamente, há duas justificativas principais para o aumento do teor de gordura do leite em vacas periparturientes suplementadas com MPR: primeiro, aumentando a quantidade de precursores de VLDL, os quais têm produção limitada neste período, e isto aumenta a exportação de triglicerídeos para a glândula mamária, onde serão incorporados à gordura do leite; ou também a metionina pode participar como doador de grupo metil, que a partir de reações de transmetilação, pode também contribuir para a síntese *de novo* dos ácidos graxos, proporcionando um aumento no teor de gordura (SAMUELSON et al., 2001).

No entanto, aparentemente, a primeira teoria consiga somente ser aplicada quando há deficiência destes precursores no organismo animal. Como justificativa para isto, estudos recentes demonstram que a metionina tem efeito mínimo sobre o lipidoma do VLDL em células hepáticas bovinas (CHANDLER e WHITE, 2017). De fato, Osorio et al. (2013) não evidenciaram diferenças significativas quando mensuraram VLDL e nível de triglicerídeo hepático, embora o teor de gordura também não tenha sido influenciado.

A segunda teoria pode ter uma abrangência maior, uma vez que a ausência de metionina (bem como de outros aminoácidos essenciais, a exemplo

de fenilalanina e leucina) tem influência negativa na síntese *de novo* dos ácidos graxos na glândula mamária (TEIXEIRA et al., 2019). Estes autores ainda encontraram que a ausência de tais aminoácidos tem relação com a diminuição da ativação do mTOR (mechanistic target of rapamycin), um gene que está relacionado com a síntese *de novo* de gordura e tem diversas funções no organismo animal, sendo muito estudada na síntese proteica (SAXTON e SABATINI, 2017).

Todavia, não foram observadas diferenças entre os tratamentos para proteína ( $P=0,20$ ), caseína ( $P=0,19$ ) e relação caseína/proteína ( $P=0,46$ ). De certa forma, mesmo com o aumento numérico apresentado, os dados chamam a atenção, uma vez que a resposta mais frequente observada na literatura é justamente o aumento, principalmente da proteína do leite (ZANTON et al., 2014). Diversos estudos apontam aumento no teor de proteína do leite com o uso de MPR (e.g., SOCHA et al., 2005; PREYNAT et al., 2009; KAUFMAN et al., 2019) principalmente pelo fato que a metionina é o primeiro aminoácido limitante para produção de proteína no leite em vacas de alta produção.

Por outro lado, Kurdna et al. (2009) também não evidenciaram diferenças significativas para proteína. Tais autores atribuem que o nível de proteína na dieta poderia ser uma justificativa. Socha et al. (2005) também indicaram que a melhor resposta de MPR foi em animais alimentados com dietas mais proteicas (18,5% vs. 16,0%). Tamura et al. (2019) também reforçaram este ponto, pois avaliando dietas com baixo teor de proteína bruta na dieta (14,5%), mesmo não alterando o nível de metionina metabolizável, não se observou diferença em produção de proteína do leite.

Ademais, Leão et al. (2017) em abordagem meta-analítica, realizou a comparação de 32 estudos publicados avaliando dietas controle e com MPR, e observaram que a maior resposta acaba sendo observada em dietas que contenham justamente mais que 16% de proteína bruta. No entanto, na avaliação do presente estudo, aparentemente esta não é uma justificativa plausível pois o nível proteico da dieta é maior que 16% (17,4% PB).

A duração de suplementação também é um fator importante. Para exemplificar tal fato, Leão et al. (2017) observaram que a maior resposta em g/d em proteína do leite está em suplementação acima de 60 dias (54 vs. 19 g/d). Tal ponto pode ser um dos fatores que podem justificar a ausência de efeitos no

presente trabalho pois a suplementação média foi de 38 dias (22 dias no pré-parto e 16 dias no pós-parto).

Ademais, os tratamentos foram similares para lactose ( $P=0,99$ ), relação gordura/proteína ( $P=0,23$ ), sólidos totais ( $P=0,26$ ) e nitrogênio ureico ( $P=0,67$ ). Por outro lado, o escore linear de células somáticas tendeu ( $P=0,08$ ) a ser maior para os animais tratados com MPR.

Os valores de brix do colostro ( $P=0,27$ ) foram similares entre os tratamentos. A avaliação deste parâmetro foi importante para verificar, de forma indireta, a qualidade do colostro em termos de IgG (QUINGLEY et al., 2013), e pelos resultados apresentados, ambos os colostros (Controle e MPR) são classificados como colostro de alta qualidade (Brix > 22%). Há indícios que a MPR tenha efeitos positivos sobre as bezerras de animais suplementados durante o período de transição, principalmente reduzindo indicadores de estresse e levando a um aumento na maturação da gliconeogênese e da oxidação de ácidos graxos, o que garante uma melhor adaptação à vida extrauterina (JACOMETO et al., 2017), como também melhorando a transferência de imunidade passiva (SUGIMOTO et al., 2019). Porém tais efeitos não foram mensurados no presente estudo.

Na avaliação do ECC e peso (Tabela 5), tanto no pré como no pós-parto, as médias ajustadas foram similares entre os tratamentos ( $P>0,05$ ). Com relação ao peso dos animais, Osorio et al. (2013) também não observaram diferenças tanto no pré-parto, quanto no pós-parto.

Todavia, na avaliação do ECC por Osorio et al. (2013), embora no pré-parto não tenha sido observada diferença significativa, no pós-parto os autores observaram uma tendência de menor ECC para as vacas suplementadas com MPR, provavelmente associada com a maior produção de leite das vacas tratadas. Por outro lado, o presente trabalho está em consonância aos outros trabalhos que não observaram diferenças para estes parâmetros (SOCHA et al., 2005; ORDWAY et al., 2009).

**Tabela 5.** Avaliação do peso e condição corporal de vacas leiteiras suplementadas com MPR durante o período de transição

<b>Parâmetro</b>	<b>Controle</b>	<b>Metionina</b>	<b>EPM</b>	<b>Valor P</b>
ECC pré-parto	3,44	3,40	0,02	0,27
ECC pós-parto	2,97	2,96	0,03	0,81
$\Delta$ ECC	-0,47	-0,43	0,02	0,33
Peso pré-parto (kg)	683	677	7,82	0,59
Peso pós-parto (kg)	640	635	7,51	0,66
$\Delta$ Peso (kg)	-44,2	-41,0	2,56	0,36
pH urina pré-parto	5,90	5,89	0,07	0,89

A variação de escore também foi similar aos resultados reportados por Osorio et al. (2013). Contudo, os autores observaram maiores perdas de peso (102,9 kg no grupo Controle vs. 120,9 kg no grupo MPR) do que o presente trabalho. Finalmente não foram observadas diferenças ( $P=0,89$ ) no pH urinário no pré-parto, mostrando que em ambos os lotes a adoção de dietas acidogênicas teve sucesso.

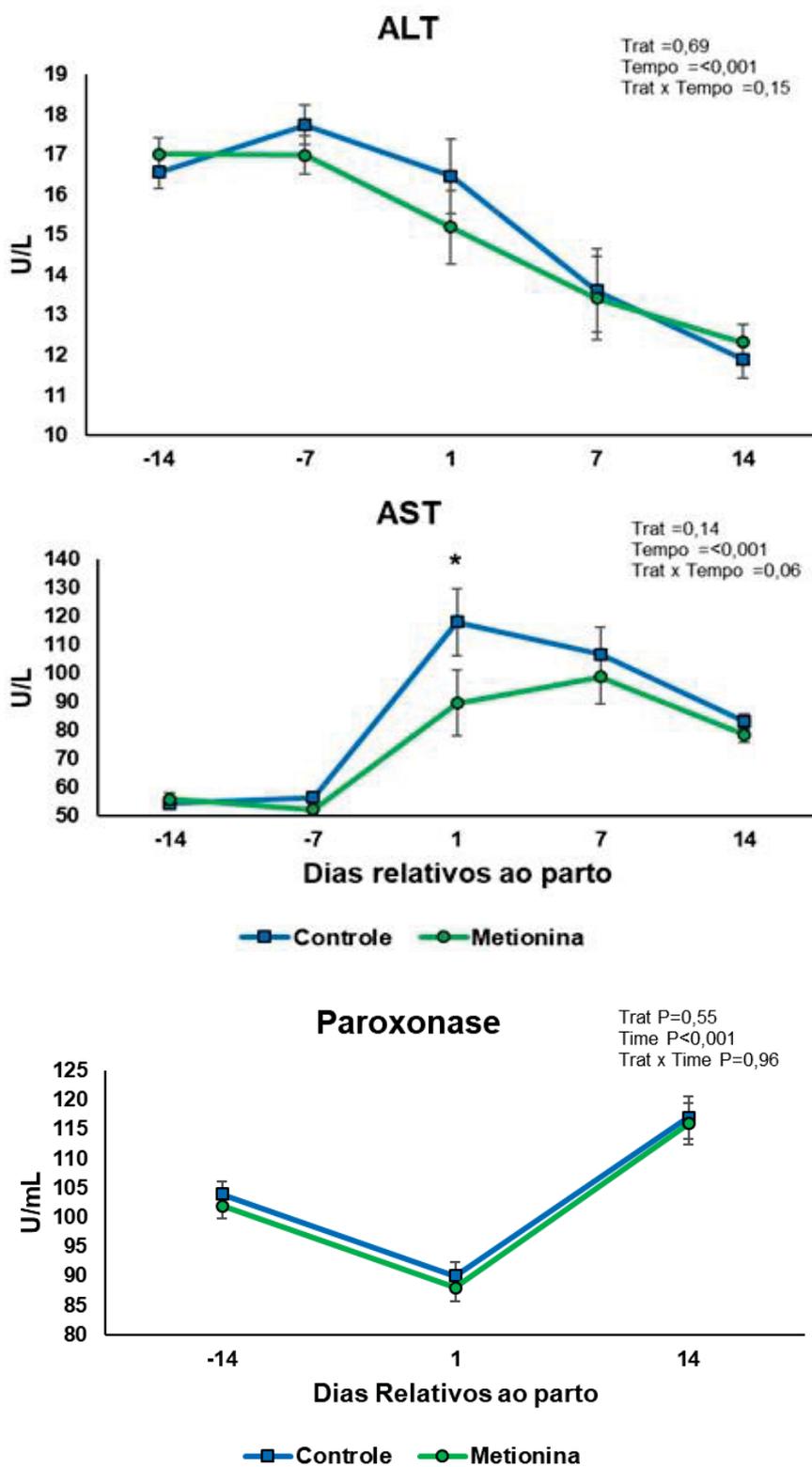
Avaliando os parâmetros metabólicos (Tabela 6), não se observaram diferenças ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos, avaliando a média dos cinco pontos de coleta. Avaliando os valores médios de alguns metabólitos, tais como as adequadas concentrações de colesterol, as modestas concentrações de AGNE e BHB e os satisfatórios valores de IFH (Índice de Funcionalidade Hepática) e relação AGNE: colesterol, conclui-se que independente dos tratamentos, as vacas experimentais apresentavam adequadas condições clínicas e boa saúde hepática.

Ademais, na avaliação de cada ponto dos parâmetros de enzimas hepáticas (Figura 3), metabolismo energético (Figura 4), metabolismo proteico (Figura 5) e cálcio e bilirrubina (Figura 6), foi possível observar as seguintes respostas desejáveis; menores valores de AST e maiores de cálcio no dia do parto e maiores valores de albumina no dia +14 para o grupo suplementado com MPR.

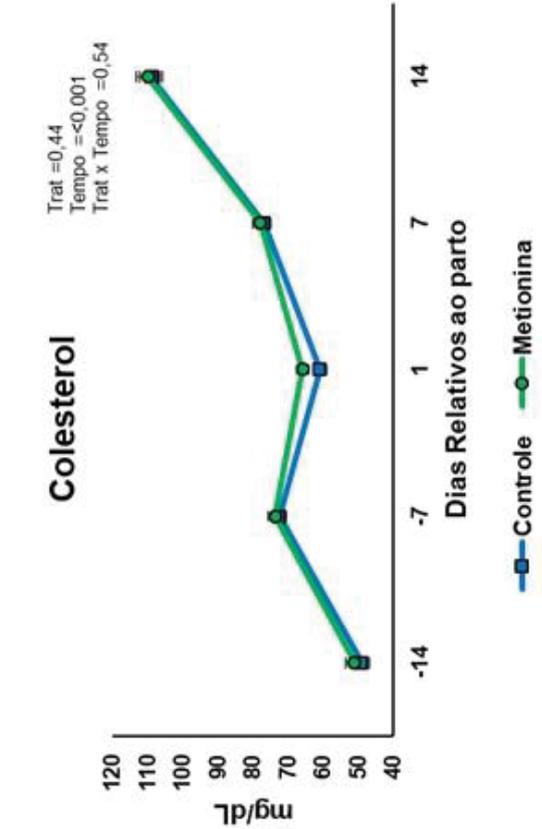
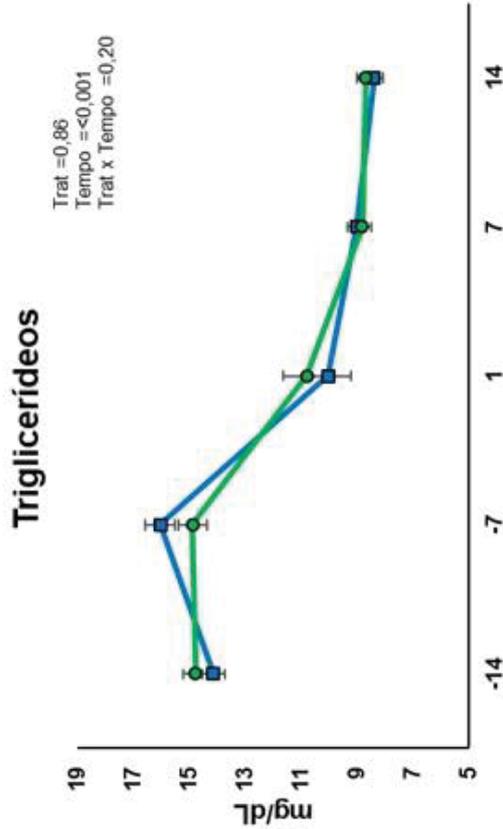
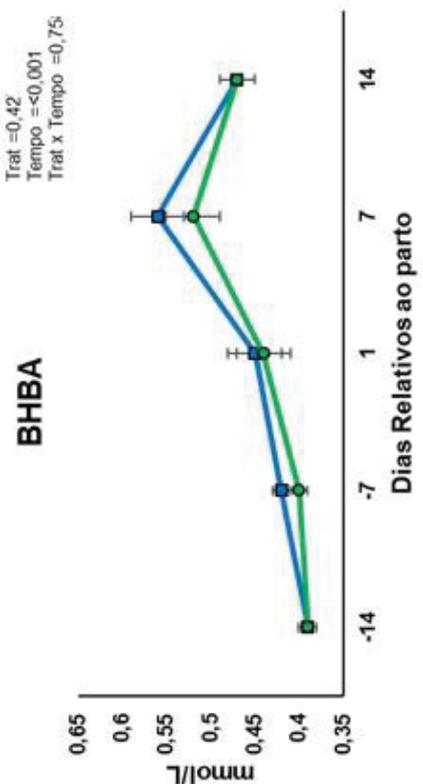
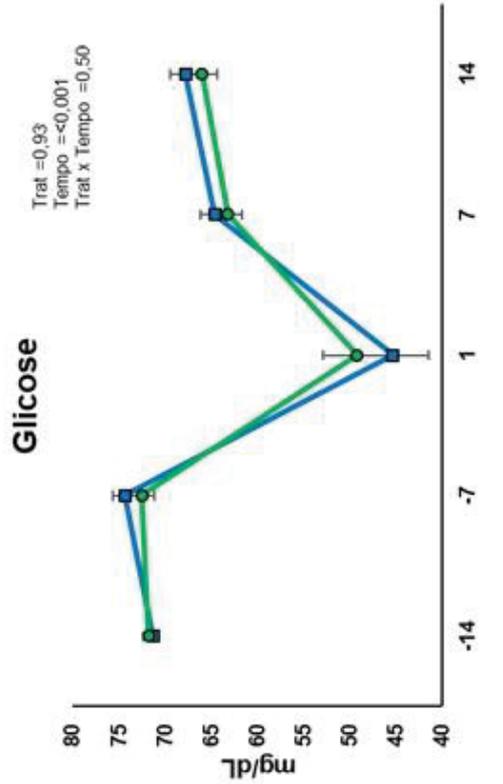
**Tabela 6.** Análise de metabólitos de vacas leiteiras suplementadas com MPR durante o período de transição

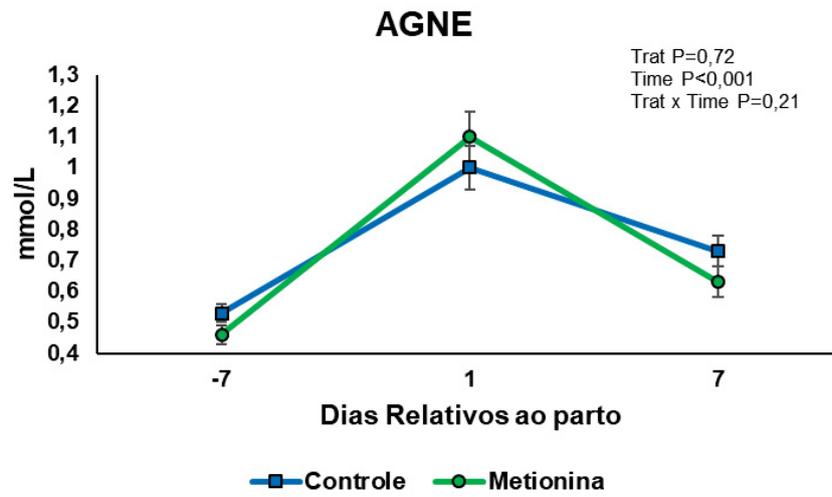
<b>Parâmetro</b>	<b>Controle</b>	<b>Metionina</b>	<b>EPM</b>	<b>Valor P</b>
ALT (U/L)	15,25	14,99	0,47	0,69
AST (U/L)	83,70	74,90	4,17	0,14
Paraoxonase (U/mL)	102,5	104,1	1,96	0,55
Triglicérides (mg/dL)	11,52	11,59	0,27	0,86
Colesterol (mg/dL)	73,73	75,76	1,85	0,44
Glicose (mg/dL)	64,70	64,58	1,10	0,93
AGNE (mmol/L)	0,75	0,73	0,03	0,72
BHB (mmol/L)	0,46	0,44	0,01	0,42
Proteína (g/dL)	6,96	6,99	0,18	0,91
Albumina (g/dL)	3,25	3,29	0,02	0,33
Globulina (g/dL)	3,51	3,54	0,06	0,78
Ureia (mg/dL)	29,07	30,05	0,66	0,29
Cálcio (mg/dL)	8,15	8,19	0,04	0,51
Bilirrubina total (mg/dL)	0,20	0,19	0,01	0,81
IFH*	2,89	3,06	0,53	0,82
AGNE/Colesterol	0,05	0,04	0,005	0,87

\* IFH = Índice de Funcionalidade Hepática

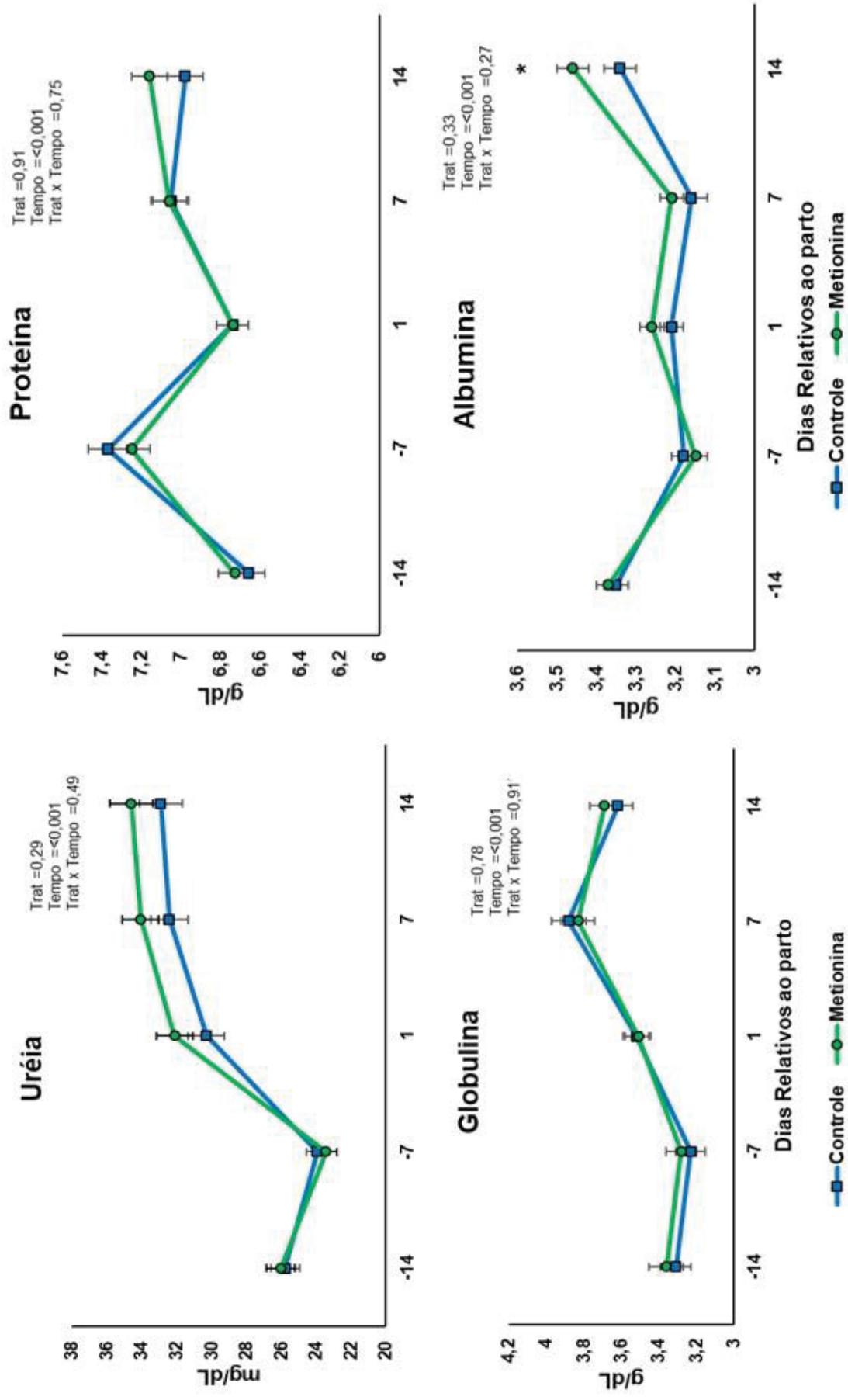


**Figura 3.** Avaliação de enzimas hepáticas de vacas suplementadas com MPR durante o período de transição.

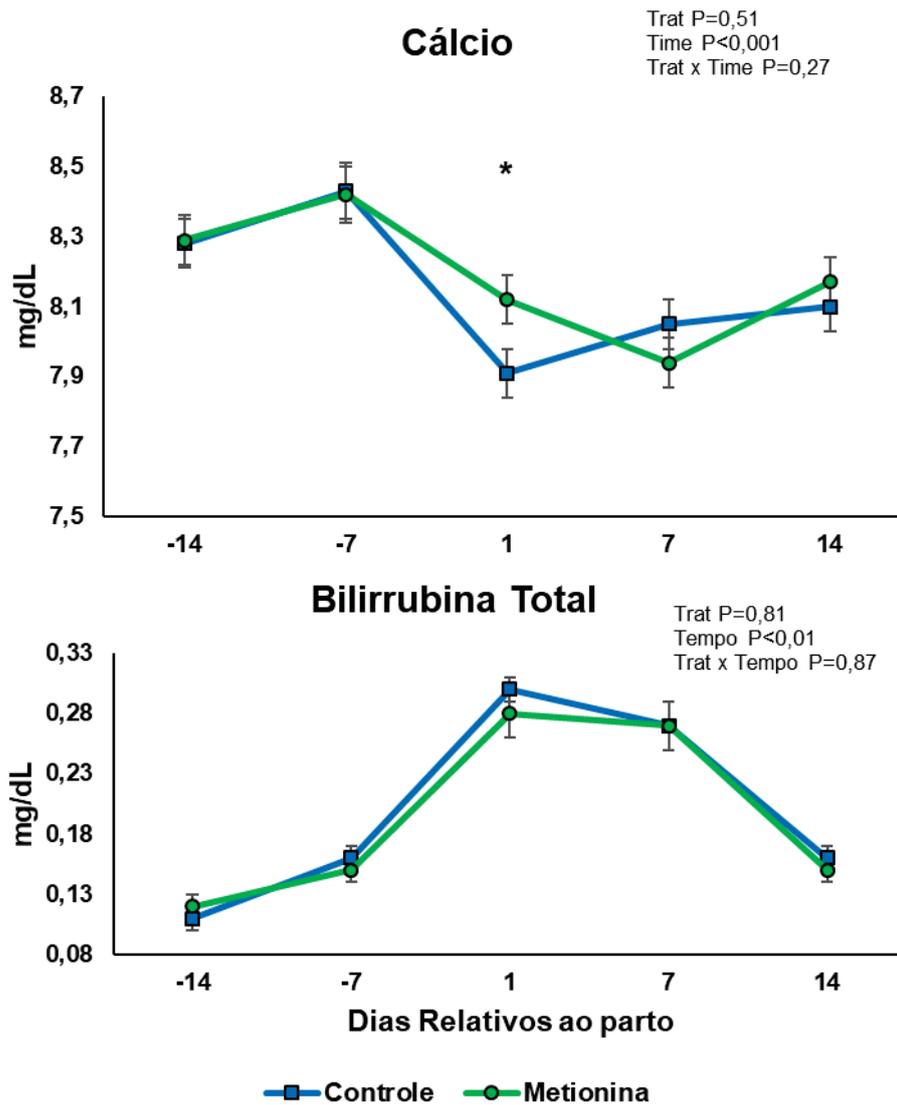




**Figura 4.** Avaliação de metabólitos energéticos de vacas suplementadas com MPR durante o período de transição



**Figura 5.** Avaliação de parâmetros do metabolismo proteico de vacas leiteiras suplementadas com MPR durante o período de transição.



**Figura 6.** Avaliação de cálcio total e bilirrubina de vacas suplementadas com MPR durante o período de transição.

Na avaliação das enzimas hepáticas, os animais do grupo controle tenderam ( $P=0,08$ ) a apresentar maiores concentrações de AST no dia do parto, comparado com os animais recebendo MPR. Tais achados são interessantes, pois sugere que a MPR proporcionou uma maior proteção ao fígado, uma vez que valores mais altos de AST são indicativos de lesão hepática, pois quando há lesão no fígado essa enzima é liberada na corrente sanguínea (COZZI et al., 2011).

Por outro lado, para AST nos 5 diferentes momentos de coleta, não foi observada diferença significativa ( $P=0,14$ ), o que corrobora com outros estudos (OSORIO et al., 2014; ZHOU et al., 2016b). Ademais, ALT e paraoxonase apresentaram similaridade entre os tratamentos, o que também já foi observado em

estudos prévios (OSORIO et al., 2014a). Para paraoxonase, por se tratar de uma enzima hepática que reduz a sua concentração em casos de alta atividade inflamatória (BIONAZ et al., 2007), esperava-se que houvesse redução deste parâmetro no grupo controle, conforme já demonstrado por outros trabalhos (ZHOU et al., 2016b). Todavia, isto não ocorreu no presente estudo.

Do ponto de vista do metabolismo energético (Figura 4), também não foram observadas diferenças entre os tratamentos. Com a suplementação de MPR, de acordo com a literatura disponível, não se altera os parâmetros glicose (ZHOU et al., 2016; BATISTEL et al., 2017), colesterol (OSORIO et al., 2014; ZHOU et al., 2016), BHB (OSORIO et al. 2013; ZHOU et al., 2016; BATISTEL et al., 2017) e triglicerídeos séricos (OSORIO et al., 2013).

Contudo, para AGNE, mesmo existindo estudos que não observaram impacto da suplementação de MPR sobre o parâmetro (OSORIO et al. 2013; ZHOU et al., 2016), um estudo conduzido pela Universidade de Illinois, EUA (BATISTEL et al., 2017), encontrou uma tendência de menores concentrações de AGNE para vacas suplementadas com MPR. Além disto, Sun et al. (2016), encontraram menores valores de AGNE e BHB e maiores valores de glicose para animais tratados com MPR, o que conferem um melhor balanço energético aos animais. A justificativa para as melhorias observadas seria uma suposta melhor eficiência de oxidação completa dos AGNE.

Para explicar tal fato, uma das possíveis explicações advém do entendimento do metabolismo inter-relacionado da metionina com a colina (PINOTTI et al., 2002). A suplementação de metionina, via de regra, por se tratar de um doador de grupo metil favorece a formação de colina, que, por conseguinte, pode atuar modulando genes específicos (e.g., Fatty Acid Transport Protein 5; FATP5) ou aumentando a disponibilidade de carnitina, os quais são fundamentais para o aumento da  $\beta$ -oxidação (SUN et al., 2016). Ademais, o aumento da oxidação pode estar veiculado com mecanismos epigenéticos, proporcionando a proliferação de peroxissomos (PPAR $\alpha$ ), os quais são organelas responsáveis por oxidar ácidos graxos de cadeia longa (OSORIO et al., 2014b). Todavia, estes mecanismos ainda não são consenso e devem ser melhor elucidados.

O metabolismo proteico, por sua vez, foi similar entre os tratamentos, com exceção da albumina no dia +14, a qual tendeu a ser maior ( $P=0,06$ ) para o grupo suplementado com MPR. A albumina geralmente tem um comportamento mais estável ao longo do período de transição (PICCIONE et al., 2011) e sua concentração é

afetada pelo funcionamento hepático, sobretudo na presença de condição inflamatória, uma vez que há redução de albumina em detrimento ao aumento de proteínas pró-inflamatórias (TENNANT e CENTER, 2008). Sendo assim, corroborando os achados supracitados com os valores de AST, permite-se sugerir que, mesmo que de forma modesta, a MPR pode melhorar a saúde hepática dos animais.

Avaliando proteínas totais, globulina e ureia, pode-se observar que os resultados encontrados se assemelham aos resultados observados em literatura (OSORIO et al., 2014; SUN et al., 2016; BATISTEL et al., 2017). Somente uma ressalva; Sun et al. (2016) observaram que animais que receberam MPR obtiveram menores valores de ureia e maiores da proteína do leite, o que implicaria em melhoria na eficiência do uso do nitrogênio. Todavia, o cenário observado no presente estudo diverge destas considerações.

Cálcio e bilirrubina, por sua vez, também foram semelhantes entre os tratamentos, com exceção do cálcio no momento do parto, o qual tendeu ( $P=0,08$ ) a ser maior para o grupo suplementado com MPR. O aumento no cálcio foi um achado interessante, uma vez que as dietas de pré-parto eram devidamente acidogênicas como pode ser observado na Tabela 5, pois o pH urinário estava dentro dos valores de referência (OETZEL, 2013) para ambos os grupos experimentais.

Com relação aos índices avaliados, nota-se que para o Índice de Funcionalidade Hepática (IFH) não houve diferenças entre os tratamentos. Uma das justificativas plausíveis seria que os animais no presente estudo, tanto MPR e controle, são classificadas como animais de alto LFI ( $LFI > 1,65$ ) de acordo com a classificação de Zhou et al. (2016b). Outra explicação para a não diferença entre animais suplementados e controle é que a partir do 16º dia todos os animais experimentais passaram a receber MPR e na fórmula de estimativa do LFI, as concentrações dos metabólitos albumina, bilirrubina e colesterol no 30º dia de lactação são consideradas.

A relação AGNE: Colesterol tem sido sugerida como um índice para a avaliação da função do fígado e um indicador de esteatose hepática. Os valores encontrados no presente trabalho, para ambos os grupos experimentais, são menores que o limiar sugerido por Anderson e Rings (2009), que indicam que vacas recém-paridas têm maior risco de apresentarem doenças no pós-parto quando este indicador for maior que  $\geq 0,3$ .

Em consonância, quando avaliado os níveis de BHB no pós-parto através de tiras de  $\beta$ -cetonas, também não se observou diferença significativa entre os grupos experimentais (Tabela 7). Tais resultados, conforme supracitado, estão em concordância com a literatura disponível (OSORIO et al. 2013; ZHOU et al., 2016; BATISTEL et al., 2017).

**Tabela 7.** Avaliação do BHB em fitas durante o período pós-parto de vacas leiteiras suplementadas ou não com MPR no período de transição

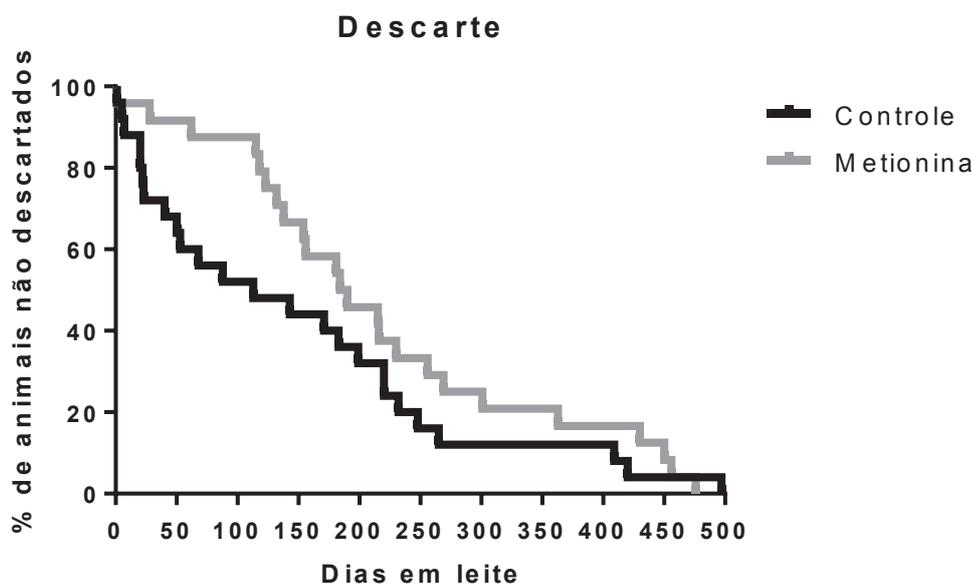
Parâmetro (mmol/L)	Controle	Metionina	EPM	Valor P
BHB dia +4	0,77	0,87	0,05	0,22
BHB dia +7	0,69	0,65	0,04	0,50
BHB dia +12	0,61	0,63	0,05	0,81

Na avaliação de doenças metabólicas, clínicas e subclínicas, as incidências foram similares ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 8). Em concordância com o presente estudo, Osorio et al. (2013) também não observaram diferenças significativas para as principais doenças metabólicas. Ademais, em comparação com Skenandore et al. (2017), observou-se maiores incidências, no presente trabalho, de retenção de placenta, deslocamento de abomaso e mastite, e menores de cetose para os animais suplementados com MPR.

Porém, quando foi avaliado o descarte, nota-se que o grupo suplementado com MPR apresentou menor taxa de descarte (2,41 vs. 12,05%) nos primeiros 60 dias ( $P=0,03$ ) e tendeu a ter um maior número de dias (227 vs. 155 dias) para ser descartado ( $P=0,08$ ). Além disto, quando se avalia a distribuição do descarte destes animais, observa-se que ocorrem majoritariamente nos primeiros 150 dias em leite para os animais controle e mais tardiamente para os animais suplementados com MPR (Figura 7). Com isto, pode-se especular que, a MPR de certa forma pode gerar condições para o animal superar as enfermidades. Notadamente, embora seja no campo especulativo uma vez que não foram mensurados parâmetros de status imunitário no presente estudo, possivelmente estes efeitos de menor descarte podem estar veiculados com os efeitos já discutidos da metionina sobre os componentes do sistema imune do animal. Aumentos no CMS e na produção de enzimas antioxidantes podem ser os principais responsáveis pelo aumento na atividade de células do sistema imune, sobretudo neutrófilos (OSORIO et al., 2013; OSORIO et al., 2014a).

**Tabela 8.** Avaliação de doenças e descarte de vacas leiteiras suplementadas com MPR durante o período de transição

Parâmetro (%)	Controle	Metionina	EPM	Valor P
Mastite clínica	6,02 (n=5/83)	9,63 (n=8/83)	0,03	0,39
Mastite subclínica	6,02 (n=5/83)	10,84 (n=9/83)	0,03	0,27
Hipocalcemia clínica	3,61 (n=3/83)	0,00 (n=0/83)	0,02	0,97
Hipocalcemia subclínica	40,96 (n=34/83)	34,94 (n=29/83)	0,05	0,42
Deslocamento de abomaso	3,61 (n=3/83)	3,61 (n=3/83)	0,03	1,00
Cetose clínica	1,20 (n=1/83)	2,40 (n=2/83)	0,01	0,56
Cetose subclínica	7,23 (n=6/83)	10,84 (n=9/83)	0,03	0,42
Metrite	3,61 (n=3/83)	4,82 (n=4/83)	0,02	0,70
Pneumonia	1,20 (n=1/83)	3,61 (n=3/83)	0,02	0,33
Retenção de placenta	7,23 (n=6/83)	7,23 (n=6/83)	0,07	1,00
Morbidade	50,60 (n=42/83)	49,40 (41/83)	0,05	0,87
Descarte total	30,12 (n=25/83)	31,71 (n=26/82)	0,05	0,82
Descarte 60 dias	12,05 (n=10/83)	2,41 (n=2/83)	0,02	0,03
Dias até o descarte	155	227	33,4	0,08



**Figura 7.** Avaliação do descarte ao longo da lactação de vacas suplementadas com MPR durante o período de transição.

Ademais, avaliando o desempenho reprodutivo, não se observou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais (Tabela 9) e também avaliando a prenhez em curva de sobrevivência (Figura 8).

O impacto da suplementação de metionina em variáveis reprodutivas tem demonstrado resultados interessantes em literatura. A exemplo, Skenandore et al.

(2017), avaliando vacas tratadas com MPR, colina protegida ou com ambos, notaram que mesmo tendo escore de cheiro no Metrichick<sup>®</sup> no dia 7 pós-parto, o que pode estar relacionado com uma carga bacteriana de *T. pyogenes*, as vacas suplementadas com MPR conseguiram se reestabelecer e normalizar este parâmetro no dia 30, ou seja, conseguiram superar o desafio microbiológico.

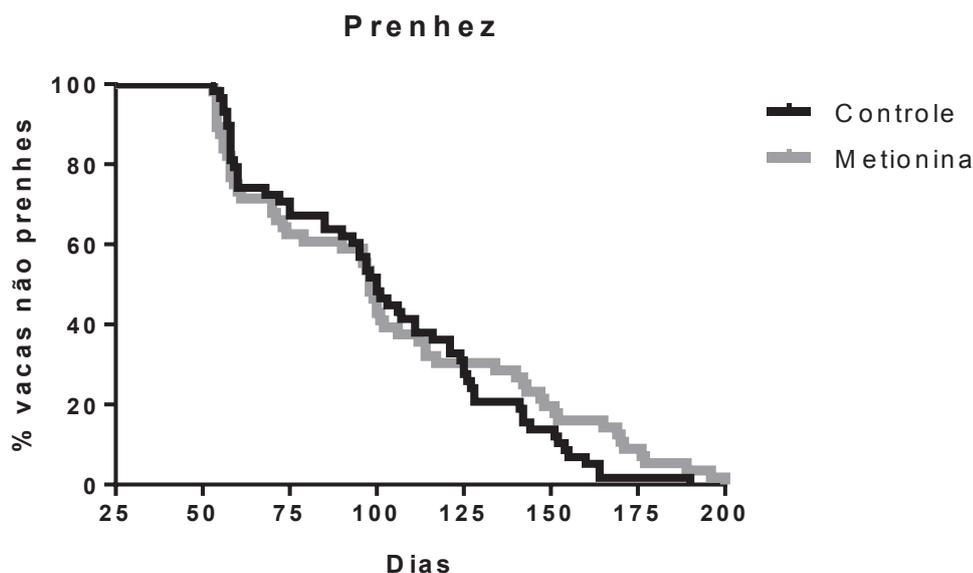
Uma possível justificativa seria a melhoria da imunidade uterina. Stella et al. (2018) observaram um aumento de glândulas epiteliais e um aumento de infiltração de neutrófilos em vacas que receberam MPR, o que por consequência poderia influenciar positivamente tanto na prenhez como também na redução de incidência de doenças uterinas, sugerindo melhor imunidade uterina.

Além disto, a MPR pode reduzir perda de prenhez em múltiparas, principalmente aumentando o tamanho do embrião (TOLEDO et al., 2017). Outro ponto seria que a MPR pode também aumentar a concentração de lipídeos no embrião (ACOSTA et al., 2016), o que conseqüentemente pode garantir um melhor desenvolvimento inicial do embrião, uma vez que tais lipídeos podem ser usados como fonte energética.

Com a somatória dos efeitos supracitados, espera-se que a suplementação com MPR aumente a taxa de prenhez e diminua os dias abertos e o número de inseminações por prenhez, conforme demonstrado por Ardalan et al. (2010). No entanto, diferentemente dos achados desses autores, o presente trabalho demonstrou baixa incidência de doenças para ambos os tratamentos, além de todos os animais receberem metionina após 16 DEL e com isto justifica-se a ausência de efeitos da MPR sobre os parâmetros reprodutivos.

**Tabela 9.** Avaliação de parâmetros reprodutivos de vacas leiteiras suplementadas com MPR durante o período de transição.

<b>Parâmetro</b>	<b>Controle</b>	<b>Metionina</b>	<b>EPM</b>	<b>Valor P</b>
Prenhez (%)	69,9 (n=58/83)	71,1 (n=59/83)	0,05	0,86
Prenhez 60 dias (%)	18,1 (n=15/83)	18,1 (n=15/83)	0,04	1,00
Prenhez 120 dias (%)	44,6 (n=37/83)	47,0 (n=39/83)	0,05	0,75
Prenhez 150 dias (%)	60,2 (n=50/83)	54,2 (n=45/83)	0,05	0,43
Dias abertos	101	103	5,42	0,76
Número de inseminações	2,16	2,06	0,16	0,66



**Figura 8.** Avaliação da prenhez ao longo da lactação de vacas suplementadas com MPR durante o período de transição.

Ademais, avaliando o nível de aminoácidos (AA) no plasma no dia +14, não se observou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais (Tabela 10), com exceção da metionina plasmática, a qual apresentou maior ( $P = 0,05$ ) concentração no grupo suplementado com MPR, indicando, assim, a efetividade da suplementação do aminoácido durante a alimentação.

Notadamente, quando é próximo ao parto, nota-se que há uma deficiência no perfil de aminoácidos das vacas leiteiras. Isto se deve, basicamente, a três fatores: (1) aumento na produção de proteínas de fase aguda positivas (e.g., haptoglobina) induzidas pelo aumento do caráter inflamatório do período; (2) aumento da mobilização de proteína muscular para gliconeogênese; (3) captação limitada de outros aminoácidos e aumento de excreção nitrogenada devido à carência de metionina (ZHOU et al., 2017).

Vale ressaltar que a metionina advinda da degradação de tecido muscular, conforme salientado por O'Connor et al. (1993), é baixa comparativamente ao que é necessário para o leite (i.e., o músculo fornece 2,0 g/100g de proteína, enquanto que o leite necessita cerca de 2,71 g/100g de proteína). Com isso, uma disponibilidade inadequada de metionina pode gerar uma limitação do uso de outros aminoácidos.

Em um estudo realizado por Zhou et al. (2017), animais suplementados com MPR obtiveram um melhor perfil de AA plasmáticos, sendo que no dia +14 relativos

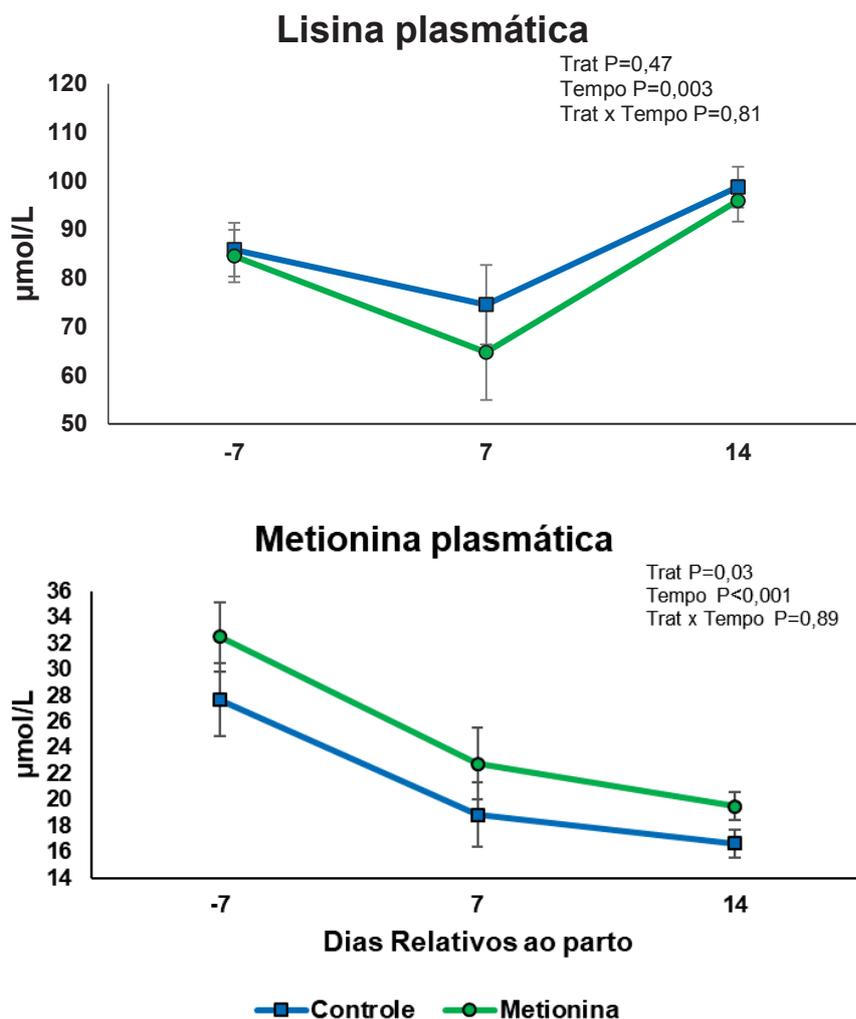
ao parto, houve aumento de metionina, arginina e lisina, o que não ocorreu no presente estudo.

**Tabela 10.** Avaliação de aminoácidos no plasma no dia +14 de vacas leiteiras suplementadas com MPR durante o período de transição

<b>AA (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	<b>Controle</b>	<b>Metionina</b>	<b>EPM</b>	<b>Valor P</b>
Alanina	234,75	232,81	11,77	0,90
Arginina	79,90	77,94	3,10	0,65
Aspartato	0,88	0,81	0,23	0,81
Fenilalanina	49,84	51,91	1,95	0,45
Glutamato	30,49	29,54	1,05	0,51
Glutamina	303,37	315,42	12,17	0,47
Glicina	385,43	369,91	14,53	0,44
Histidina	57,17	55,78	2,08	0,63
Isoleucina	152,46	138,03	6,41	0,11
Leucina	147,91	136,28	6,65	0,21
Lisina	80,43	75,32	4,74	0,44
Metionina	17,56	19,99	0,90	0,05
Prolina	66,98	65,07	2,66	0,61
Serina	100,35	108,03	3,99	0,16
Treonina	51,78	50,03	2,67	0,64
Triptofano	49,28	47,38	1,72	0,42
Tirosina	60,71	62,13	2,82	0,72
Valina	200,32	175,40	10,17	0,08

Além disso, os valores médios de metionina plasmática foram superiores no trabalho de Zhou et al. (2017) comparativamente ao presente estudo, o que pode levar a conclusão de que pode ocorrer alguma limitação da eficiência de uso de outros aminoácidos.

Isto pode ser reforçado quando é avaliado lisina e metionina plasmática (Figura 9). Nota-se que para metionina, os valores foram maiores ( $P=0,03$ ) para o grupo suplementado com MPR durante todo o período de suplementação. Todavia, não se observou diferença para lisina plasmática entre os tratamentos ( $P=0,47$ ).



**Figura 9.** Avaliação da concentração de metionina plasmática de vacas suplementadas com MPR durante o período de transição.

Embora, para lisina não se tenha observado diferença no comportamento, a resposta em metionina parece estar de acordo com a literatura mais recente (ZHOU et al., 2017), que demonstra que animais suplementados aumentaram não somente a concentração de metionina, mas também todos os compostos sulfurados que são derivados do aminoácido, o que é um indicativo do aumento da transulfuração.

### 3.4 CONCLUSÕES

A suplementação de metionina protegida ruminalmente apresentou efeitos positivos, principalmente com o incremento no teor de gordura do leite e a redução no descarte nos primeiros 60d, além da suplementação se mostrar efetiva, uma vez que os níveis de metionina plasmáticas foram superiores para o grupo suplementado com

MPR. Todavia, observa-se que, para os outros parâmetros avaliados, os resultados apresentados, em linhas gerais, foram similares entre os tratamentos.

### 3.5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Adisseo pelo suporte financeiro deste projeto, bem como a todos os funcionários da Fazenda Frank'Anna por todo o suporte para condução do experimento de campo.

### 3.6 REFERÊNCIAS

ACOSTA, D.A.V.; DENICOL, A.C.; TRIBULO, P.; RIVELLI, M.I.; SKENANDORE, C.; ZHOU, Z.; LUCHINI, D.; CORRÊA, M.N.; HANSEN, P.J.; CARDOSO, F.C. Effects of rumen-protected methionine and choline supplementation on the preimplantation embryo in Holstein Cows. **Theriogenology**, p.1-11, 2016.

ANDERSON, D.E., RINGS, M. **Current veterinary therapy: food animal practice**. St.Louis, MO: Saunders Elsevier. *In*: PENN STATE EXTENSION, 2009.

ARDALAN, M.; REZAYAZDI, K.; DEGHAN-BANADAKY, M. Effect of rumen-protected choline and methionine on physiological and metabolic disorders and reproductive indices of dairy cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.94, e259-e265, 2010.

BATISTEL, F.; ARROYO, J.M.; BELLINGERI, A.; WANG, L.; SAREMI, B.; PARYS, C.; TREVISI, E.; CARDOSO, F.C.; LOOR, J.J. Ethyl-cellulose rumen-protected methionine enhances performance during the periparturient period and early lactation in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.100, p.1-13, 2017.

BERTONI, G.; TREVISI, E. Use of the liver activity index and other metabolic variables in the assessment of metabolic health in dairy herds. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.29, n.2, p.413-431, 2013.

BIONAZ, M.; TREVISI, E.; CALAMARI, L.; LIBRANDI, F.; FERRARI, A.; BERTONI, G. Plasma Paroxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.1740-1750, 2007.

BROWNE, R. W.; KOURY, S.T.; MARION, S.; WILDING, G.; MUTI, P.; TREVISAN, M. Accuracy and biological variation of human serum paraoxonase 1 activity and polymorphism (Q192R) by kinetic enzyme assay. **Clinical Chemistry**, v.53, n.2, p.310-317, 2007.

BURKE, C.R.; MEIER, S.; MCDUGALL, S.; COMPTON, C.; MITCHELL, M.; ROCHE, J.R. Relationships between endometritis and metabolic state during the transition period in pasture-grazed dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.5363-5373, 2010.

CHANDLER, T.L.; WHITE, H.M. Choline and methionine differentially alter methyl carbon metabolism in bovine neonatal hepatocytes. **PLoS ONE**, v.12, n.2, e0171080, 2017.

CHIOGNA JÚNIOR, V.; LOPES, F.; TOLEDO, M.; COLLAO-SAENZ, E. Rumen-protected methionine supplementation on productive performance and plasma amino acids concentration on early lactation of high producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.102, (Suppl. 1), p.75, 2019.

COSTA, C.P.N.; BREZOLIN, L. Um olhar empresarial na produção de leite. **Janus**, Lorena, v.10, n.17, 2014.

COZZI, G.; RAVAROTTO, L.; GOTTARDO, F.; STEFANI, A.L.; CONTIERO, B.; MORO, L.; BRSCIC, M.; DALVIT, P. Short communication: reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: Effects of parity, stage of lactation, and season of production. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.3895-3901, 2011.

DRACKLEY, J.K. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? **Journal of Dairy Science**, v.82, 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, p.68-78, 1989.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. Forage fiber analysis: apparatus reagents, procedures and some applications. Washington, D. C, [s.n.], Agricultural Handbook, p.379, 1970.

JACOMETO, C.B.; ZHOU, Z.; LUCHINI, D.; CORREA, M.N.; LOOR, J.J. Maternal supplementation with rumen-protected methionine increases prepartal plasma

methionine concentration and alters hepatic mRNA abundance of 1-carbon, methionine, and transsulfuration pathways in neonatal Holstein calves. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.1-11, 2017.

KAUFMAN, J.; BAILEY, H.; BARTON, B.; ZIMMERMAN, C.; ESTES, K.; RIUS, A. Comparison of two sources and levels of rumen-protected methionine on plasma concentration and mammary clearance of methionine and milk production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.102, (Suppl. 1), p.77, 2019.

KURDNA, V.; ILLEK, J.; MAROUNEK, M.; NGOC, A.N. Feeding ruminally protected methionine to pre and postpartum dairy cows: effect on milk performance, milk composition and blood parameters. **Czech Journal of Animal Science**, v.54, n.9, p.395–402, 2009.

LEÃO, G.F.M.; DOREA, J.R.R.; DANES, M.C.A. Factors affecting performance responses to supplementation of rumen-protected methionine for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.100 (Suppl. 2), p.93-94, 2017.

MCART, J.A.A., NYDAM, D.V., OETZEL, G.R. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.5056-5066, 2012.

MICHELOTTI, T.C.; PACHECO, H.A.; LOPES, F.; ALMEIDA, R. Effects of rumen-protected methionine supplementation on dairy cows during early postpartum. **Journal of Dairy Science**, v.101 (Suppl. 2), p.109, 2018.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle –NRC**. Washington, D.C.: National Academy Press. 2001. 157p.

O'CONNOR, J.D.; SNIFFEN, C.J.; FOX, D.G.; CHALUPA, W. A Net Carbohydrate and Protein System for Evaluating Cattle Diets: IV. Predicting Amino Acid Adequacy. **Journal of Animal Science**, v.71, p.1298-1311, 1993.

OETZEL, G. R. **Minimizing hypocalcemia during early lactation**. Proceedings of the Tri-State Dairy Nutrition Conference, n. 608, p. 23–34, 2013.

ORDWAY, R.S.; BOUCHER, S.E.; WHITEHOUSE, N.L.; SCHWAB, C.G.; SLOAN, B.K. Effects of providing two forms of supplemental methionine to periparturiente Holstein dairy cows on feed intake and lactational performance. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.5154-5166, 2009.

OSORIO, J.S; JI, P.; DRACKLEY, J.K.; LUCHINI, D.; LOOR, J.J. Smartamine M and MetaSmart supplementation during the peripartal period alter hepatic expression of gene networks in 1-carbon metabolism, inflammation, oxidative stress, and the growth hormone–insulin-like growth factor 1 axis pathways. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.7451-7464, 2014a.

OSORIO, J.S; TREVISI, E.; JI, P.; DRACKLEY, J.K.; LUCHINI, D.; BERTONI, G.; LOOR, J.J. Supplemental Smartamine M or MetaSmart during the transition period benefits postpartal cow performance and blood neutrophil function. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.6248-6263, 2013.

OSORIO, J.S; TREVISI, E.; JI, P.; 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**, Savoy, v.97, p.7437-7450, 2014b.

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, p.2105-2118, 2010.

PICCIONE, G.; MESSINA, V.; SHEMBARI, A.; CASELLA, S.; GIANNETTO, C.; ALBERGHINA, D. Pattern of serum protein fractions in dairy cows during different stages of gestation and lactation. **Journal of Dairy Research**, v.78, p.421–425, 2011.

PINOTTI, L.; BALDI, A.; DELL'ORTO, V. Comparative mammalian choline metabolism with emphasis on the high-yielding dairy cow. **Nutrition Research Reviews**, v.15, p.315-331, 2002.

PREYNAT, A.; LAPIERRE, H.; THIVIERGE, M.C.; PALLIN, M.F.; MATTE, J.J.; DESROCHERS, A.; GIRARD, C.L. Effects of supplements of folic acid, vitamin B12, and rumen-protected methionine on whole body metabolism of methionine and glucose in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.677-689, 2009.

QUIGLEY, J.D.; LAGO, A.; CHAPMAN, C.; ERICKSON, P.; POLO, J. Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.1148-1155, 2013.

REINHARDT, T.A.; LIPPOLIS, J.D.; McCLUSKEY, B.J.; GOFF, J.P.; HORST, R.L. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. **The Veterinary Journal**, v.188, p.122-124, 2011.

ROCHE, J.R.; BELL, A.W.; OVERTON, T.R.; LOOR, J.J. Nutritional management of the transition cow in the 21st century ;: À a paradigm shift in thinking. **Animal Production Science**, v.53, n.9, p.1000-1023, 2013.

SAMUELSON, D.J.; DENISE, S.K.; ROFFLER, R.; AX, R.L.; ARMSTRONG, D.V.; ROMAGNOLO, D.F. Response of Holstein and Brown Swiss cows fed alfalfa hay-based diets to supplemental methionine at two stages of lactation. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.4, p. 917-928, 2001.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's Guide**: statistics, version 6. 4.ed. North Caroline, v.3, 943p. 2002.

SAXTON, R.A.; SABATINI, D.M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. **Cell**, v.168, p.960-976, 2017.

SHERMA, N.; SINGH, N.K.; BHADWAL, M.S. Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v.24, n.3, p.429-438, 2011.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de Alimentos, métodos químicos e biológicos**. 3ª. ed. - 4ª reimpressão. Universidade Federal de Viçosa, p.235, 2009.

SKENANDORE, C.S.; ACOSTA, D.A.V., ZHOU, Z.; RIVELLI, M.I.; CORREA, M.N.; LUCHINI, D.; CARDOSO, F.C. Effects of rumen-protected methionine and choline supplementation on vaginal discharge and uterine cytology of Holstein cows. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v.5, p.1-7, 2017.

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, p.1113-1126, 2005.

SORDILLO, L.M. Nutritional Strategies to optimize dairy cattle immunity. **Journal of Dairy Science**, v.99, p. 4967-4982, 2016.

STELLA, S.L.; VELASCO-ACOSTA, D.A.; SKENANDORE, C.; ZHOU, Z.; STEELMAN, A.; LUCHINI, D.; CARDOSO, F.C. Improved uterine immune mediators

in Holstein cows supplemented with rumen-protected methionine and discovery of neutrophil extracellular traps (NET). **Theriogenology**, v.114, p.116-125, 2018.

STOKOL, T.; NYDAM, D.V. Effect of anticoagulant and storage conditions on bovine nonesterified fatty acid and beta-hydroxybutyrate concentrations in blood. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.3139-3144, 2005.

SUGIMOTO, Y.; SUMIYA, S.; HARUNO, A.; MIURA, M.; SHINZATO, I.; SATAKE, N. Maternal supplementation of rumen-protected lysine and methionine during the close-up period improves the nutritional status of Holstein calves. **Journal of Dairy Science**, v.102, (Suppl. 1), p.61, 2019.

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**, v.8, n.8, e0160659, 2016.

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

TAMURA, T.; INOUE, K.; NISHIKI, H.; SAKATA, M.; SEKI, M.; KOGA, T.; OOKUBO, Y.; AKUTSU, K.; SATO, S.; SAITOU, K.; SHINOHARA, H.; KURAI, T.; HAJIKAWA, H.; KURIHARA, M. Effects of rumen-protected methionine on milk production in early lactation dairy cattle fed with a diet containing 14.5% crude protein. **Animal Science Journal**, v.90, p.62-70, 2019.

TEIXEIRA, I.A.M.A.; YODER, P.S.; HUANG, E.; HUANG, X.; HANIGAN, M.D. Essential amino acids influence milk fat synthesis in mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, v.102, (Suppl. 1), p.119, 2019.

TENNANT, B.C.; CENTER, S.A. **Hepatic function**, p.379-412. In: Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. (Eds), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6<sup>th</sup> ed. Academic Press, Burlington, 2008.

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

VAN DER DRIFT, S.G.A.; HOUWELING, M.; SCHONEWILLE, J.T.; TIELENS, A.G.; JORRITSMA, R. Protein and fat mobilization and associations with serum Beta-hydroxybutyrate concentrations in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.95, p. 4911-4920, 2012.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition, **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583-3597, 1991.

ZANTON, G.I.; BOWMAN, G.R.; VAZQUEZ-AÑON, M.; 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**, v.97, p.7085-7101, 2014.

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, p.8956-8969, 2016b.

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, p.1-17, 2016a.

ZHOU, Z.; VAILATI-RIBONI, M.; LUCHINI, D.; LOOR, J.J. Methionine and choline supply during the periparturient period alter plasma amino acid and one-carbon metabolism profiles to various extents: Potential role in hepatic metabolism and antioxidant status. **Nutrients**, v.9, p.10, 2017.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Ao finalizar o trabalho de pesquisa, pode-se tirar como conclusão a alta complexidade do organismo animal, sobretudo das vacas leiteiras no período de transição. A biologia destes animais possui muitas nuances e certamente ainda pouco ainda é conhecido perante a vastidão de detalhes que distinguem uma vaca que possui alta produtividade e saúde no início da lactação para outra que não possui.

A metionina, por mais que seja amplamente estudada e diversos estudos executados, ainda é um tópico que merece a atenção e que deve ser ainda mais estudado, pois aparentemente suas funções podem variar com o status metabólico e nível produtivo do animal.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA, D.A.V.; DENICOL, A.C.; TRIBULO, P.; RIVELLI, M.I.; SKENANDORE, C.; ZHOU, Z.; LUCHINI, D.; CORRÊA, M.N.; HANSEN, P.J.; CARDOSO, F.C. Effects of rumen-protected methionine and choline supplementation on the preimplantation embryo in Holstein Cows. **Theriogenology**, p.1-11, 2016.
- ADEWUYI, A.A.; GRUYS, E.; VAN EERDENBURG, F.J.C.M. Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle: A review. **Veterinary Quarterly**, v.27, n.3, p.117-126, 2005.
- ALLEN, M. S.; BRADFORD, B. J.; OBA, M. Board-invited review: the hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 3317-3334, 2009.
- ANDERSON, D.E., RINGS, M. **Current veterinary therapy: food animal practice**. St.Louis, MO: Saunders Elsevier. *In*: PENN STATE EXTENSION, 2009.
- ARDALAN, M.; REZAYAZDI, K.; DEGHAN-BANADAKY, M. Effect of rumen-protected choline and methionine on physiological and metabolic disorders and reproductive indices of dairy cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.94, e259-e265, 2010.
- 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.
- AZEVEDO, R.A.; COELHO, S.G. Resistência à insulina no período de transição de vacas leiteiras. **Nutritime**, v.13, n.6, p.4895-4901, 2016.
- BATISTEL, F.; ARROYO, J.M.; BELLINGERI, A.; WANG, L.; SAREMI, B.; PARYS, C.; TREVISI, E.; CARDOSO, F.C.; LOOR, J.J. Ethyl-cellulose rumen-protected methionine enhances performance during the periparturient period and early lactation in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.1-13, 2017.
- BAUMAN, D.E.; CURRIE, B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of Dairy Science**, v.63, p.1514-1529, 1980.

BELL, A. L.; BURHANS, W. S.; OVERTON, T. R. Protein nutrition in late pregnancy, maternal protein reserves and lactation performance in dairy cows. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.59, p.119-126, 2000.

BELL, A. W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2820-2833, 1995.

BERTONI, G.; TREVISI, E. Use of the liver activity index and other metabolic variables in the assessment of metabolic health in dairy herds. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.29, n.2, p.413-431, 2013.

BERTONI, G.; TREVISI, E.; HAN, X.; BIONAZ, M. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.3300-3310, 2008.

BIONAZ, M.; TREVISI, E.; CALAMARI, L.; LIBRANDI, F.; FERRARI, A.; BERTONI, G. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.1740-1750, 2007.

BRADFORD, B.J.; YUAN, K.; FARNEY, J.K.; MAMEDOVA, L.K.; CARPENTER, A.J. Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.6631-6650, 2015.

BROWNE, R. W.; KOURY, S.T.; MARION, S.; WILDING, G.; MUTI, P.; TREVISAN, M. Accuracy and biological variation of human serum paraoxonase 1 activity and polymorphism (Q192R) by kinetic enzyme assay. **Clinical Chemistry**, v.53, n.2, p.310-317, 2007.

BURKE, C.R.; MEIER, S.; MCDUGALL, S.; COMPTON, C.; MITCHELL, M.; ROCHE, J.R. Relationships between endometritis and metabolic state during the transition period in pasture-grazed dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.5363-5373, 2010.

CARDOSO, F.C.; LeBLANC, S.J.; MURPHY, M.R.; DRACLEY, J.K. Prepartum nutritional strategy affects reproductive performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.5859-5871, 2013.

CARNEIRO, E. W.; HONORATO, S. H.; ICHIKAWA E. E.; ALMEIDA, R. Increased serum calcium in dairy cows with oral calcium formate supplementation in the postpartum period. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.87-88, 2017.

CHAGAS, L.M.; LUCY, M.C.; BACK, P.J.; BLACHE, D.; LEE, J.M.; GORE, P.J.S.; SHEAHAN, A.A. Insulin resistance in divergent strains of Holstein-Friesian dairy cows offered fresh pasture and increasing amounts of concentrate in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p.216-222, 2009.

CHANDLER, T.L.; WHITE, H.M. Choline and methionine differentially alter methyl carbon metabolism in bovine neonatal hepatocytes. **PLoS ONE**, v.12, n.2, e0171080, 2017.

CHAPINAL, N.; CARSON, M.; LEBLANC, S.J.; LESLIE, K.E.; GODDEN, S.; CAPEL, M.; SANTOS, J.E.P.; OVERTON, M.W.; DUFFIELD, T.F. The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p.1301-1309, 2012.

CHASE, L.E.; HIGGS, R.J.; VAN AMBURGH, M.E. **Feeding low crude protein rations to dairy cows – What have we learned?** Florida Ruminant Nutrition Symposium, p.32-43, 2012.

CHIOGNA JÚNIOR, V.; LOPES, F.; TOLEDO, M.; COLLAO-SAENZ, E. Rumens-protected methionine supplementation on productive performance and plasma amino acids concentration on early lactation of high producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.102, (Suppl. 1), p.75, 2019.

COSTA, C.P.N.; BREZOLIN, L. Um olhar empresarial na produção de leite. **Janus**, Lorena, v.10, n.17, 2014.

COZZI, G.; RAVAROTTO, L.; GOTTARDO, F.; STEFANI, A.L.; CONTIERO, B.; MORO, L.; BRSCIC, M.; DALVIT, P. Short communication: reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: Effects of parity, stage of lactation, and season of production. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.3895-3901, 2011.

DRACKLEY, J.K. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? **Journal of Dairy Science**, v.82, p.2259-2273, 1999.

DRACKLEY, J.K. **Physiological adaptations in transition dairy cows**. Minnesota Dairy Herd Health Conference, St. Paul, MN. University of Minnesota, St. Paul. 74-8, 2004.

DRACKLEY, J.K.; WALLACE, R.L.; GRAUGNARD, D. Visceral adipose tissue mass in nonlactating dairy cows fed diets differing in energy density. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.3420-3430, 2014.

DUFFIELD, T. F., K. D. LISSEMORE, B. W. MCBRIDE, K. E. LESLIE. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.571–580, 2009.

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, p.68-78, 1989.

GIALLONGO, F.; HARPER, M.T.; OH, J.; LOPES, J.C.; LAPIERRE, H.; PATTON, R.A.; PARYSLL, C.; SHINZATO, L.; HRISTOV, A.N. Effects of rumen-protected methionine, lysine, and histidine on lactation performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.99, p.1-16, 2016.

GIALLONGO, F.; HRISTOV, A.N.; OH, J.; FREDERICK, T.; WEEKS, H.; WERNER, J.; LAPIERRE, H.; PATTON, R.A.; GEHMAN, A.; PARYSLL, C. Effects of slow-release urea and rumen-protected methionine and histidine on performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.1-17, 2015.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. Forage fiber analysis: apparatus reagents, procedures and some applications. Washington, D. C, [s.n.], Agricultural Handbook, p.379, 1970.

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

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006, 357p.

GRUMMER, R. R. **Insulin resistance in transition dairy cows: friend or foe?** Pacific Nutrition Conference. 2016.

HENRY, J. B. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 1995.

HERDT, T. H. Ruminant adaptation to negative energy balance influences on the etiology of ketosis and fatty liver. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.16, p.215-230, 2000.

HUSNAIN, A.; SANTOS, JEP. Meta-analysis of the effects of prepartum dietary protein on performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.102, p.9791-9813, 2019.

JACOMETO, C.B.; ZHOU, Z.; LUCHINI, D.; CORREA, M.N.; LOOR, J.J. Maternal supplementation with rumen-protected methionine increases prepartal plasma methionine concentration and alters hepatic mRNA abundance of 1-carbon, methionine, and transsulfuration pathways in neonatal Holstein calves. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.1-11, 2017.

KALAITZAKIS, E.; PANOUSIS, N.; ROUBIES, N.; GIADINIS, N.; KALDRYMIDOU, E.; GEORGIADIS, M.; KARATZIAS, H. Clinico-pathological evaluation of downer dairy cows with fatty liver. **Canadian Veterinary Journal**, v.51, p.615-622, 2010.

KAUFMAN, J.; BAILEY, H.; BARTON, B.; ZIMMERMAN, C.; ESTES, K.; RIUS, A. Comparison of two sources and levels of rumen-protected methionine on plasma concentration and mammary clearance of methionine and milk production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.102, (Suppl. 1), p.77, 2019.

KIM, I.H.; SUH, G.H.; Effect of the amount of body condition loss from the dry to near calving periods on the subsequent body condition change, occurrence of postpartum diseases, metabolic parameters and reproductive performance in Holstein dairy cows. **Theriogenology**, V.60, N.8, p.1445-56, 2003.

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

KOZLOSKI, G.V. Bioquímica dos ruminantes. 2. ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2009. 216p.

KURDNA, V.; ILLEK, J.; MAROUNEK, M.; NGOC, A.N. Feeding ruminally protected methionine to pre and postpartum dairy cows: effect on milk performance, milk composition and blood parameters. **Czech Journal of Animal Science**, v.54, n.9, p.395-402, 2009.

LEAN, I.J.; SANTOS, J.E.P.; BLOCK, E.; GOLDBERGER, H.M. Effects of prepartum dietary cation-anion difference intake on production and health of dairy cows: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v.102, p.1-31, 2019.

LEÃO, G.F.M.; DOREA, J.R.R.; DANES, M.C.A. Factors affecting performance responses to supplementation of rumen-protected methionine for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.100 (Suppl. 2), p.93-94, 2017.

LEBLANC, S. **Monitoring programs for transition dairy cows**. XXIV World Buiatrics Congress, Nice – França, 2005.

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

MCART, J.A.A., NYDAM, D.V., OETZEL, G.R. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.5056-5066, 2012.

McART, J.A.A.; NYDAM, D.V.; OETZEL, G.R.; OVERTON, T.R.; OSPINA, P.A. Elevated non-esterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. **The Veterinary Journal**, v.198, p.560-570, 2013.

MICHELOTTI, T.C.; PACHECO, H.A.; LOPES, F.; ALMEIDA, R. Effects of rumen-protected methionine supplementation on dairy cows during early postpartum. **Journal of Dairy Science**, v.101 (Suppl. 2), p.109, 2018.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requeriments of Dairy Cattle –NRC**. Washington, D.C.: National Academy Press. 2001. 157p.

NDLOVU, T.; CHIMONYO, M.; OKOH, A.; MUCHENJE, V.; DZAMA, K.; RAATS, JG. Assessing the nutritional status of beef cattle: current practices and future prospects. **African Journal of Biotechnology**, v.6, p.2727-2734, 2007.

O'CONNOR, J.D.; SNIFFEN, C.J.; FOX, D.G.; CHALUPA, W. A Net Carbohydrate and Protein System for Evaluating Cattle Diets: IV. Predicting Amino Acid Adequacy. **Journal of Animal Science**, v.71, p.1298-1311, 1993.

OETZEL, G. R. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.20, p.651-674, 2004.

OETZEL, G. R. **Minimizing hypocalcemia during early lactation**. Proceedings of the Tri-State Dairy Nutrition Conference, n. 608, p. 23–34, 2013.

ORDWAY, R.S.; BOUCHER, S.E.; WHITEHOUSE, N.L.; SCHWAB, C.G.; SLOAN, B.K. Effects of providing two forms of supplemental methionine to periparturiente Holstein dairy cows on feed intake and lactational performance. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.5154-5166, 2009.

ORTOLANI, E. Aspectos clínicos, epidemiológicos e terapêuticos da hipocalcemia de vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.47, p.799-808, 1995.

OSORIO, J.S; JI, P.; DRACKLEY, J.K.; LUCHINI, D.; LOOR, J.J. Smartamine M and MetaSmart supplementation during the peripartal period alter hepatic expression of gene networks in 1-carbon metabolism, inflammation, oxidative stress, and the growth hormone–insulin-like growth factor 1 axis pathways. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.7451-7464, 2014a.

OSORIO, J.S; TREVISI, E.; JI, P.; DRACKLEY, J.K.; LUCHINI, D.; BERTONI, G.; LOOR, J.J. Supplemental Smartamine M or MetaSmart during the transition period benefits postpartal cow performance and blood neutrophil function. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.6248-6263, 2013.

OSORIO, J.S; TREVISI, E.; JI, P.; 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**, Savoy, v.97, p.7437-7450, 2014b.

OSPINA, P. A.; NYDAM, D.V.; STOKOL, T.; OVERTON, T.R. Associations of elevated nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the Northeastern United States. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.1596-1603, 2010.

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, p.2105-2118, 2010.

PEREIRA, M.N. **Suplementação de metionina para melhorar a produtividade da vaca leiteira**. Simpósio Nacional da Vaca Leiteira, p.34-51, 2014.

PICCIONE, G.; MESSINA, V.; SHEMBARI, A.; CASELLA, S.; GIANNETTO, C.; ALBERGHINA, D. Pattern of serum protein fractions in dairy cows during different stages of gestation and lactation. **Journal of Dairy Research**, v.78, p.421–425, 2011.

PINOTTI, L.; BALDI, A.; DELL'ORTO, V. Comparative mammalian choline metabolism with emphasis on the high-yielding dairy cow. **Nutrition Research Reviews**, v.15, p.315-331, 2002.

PREYNAT, A.; LAPIERRE, H.; THIVIERGE, M.C.; PALLIN, M.F.; MATTE, J.J.; DESROCHERS, A.; GIRARD, C.L. Effects of supplements of folic acid, vitamin B12, and rumen-protected methionine on whole body metabolism of methionine and glucose in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.677-689, 2009.

QUIGLEY, J.D.; LAGO, A.; CHAPMAN, C.; ERICKSON, P.; POLO, J. Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.1148-1155, 2013.

QUIROZ-ROCHA, G.F.; LEBLANC, S.J.; DUFFIELD, T.F.; WOOD, D.; LESLIE, K.E.; JACOBS, R.M. Reference limits for biochemical and hematological analytes of dairy cows one week before and one week after parturition. **Canadian Veterinarian Journal**, v.50, p.383-388, 2009.

REINHARDT, T.A.; LIPPOLIS, J.D.; McCLUSKEY, B.J.; GOFF, J.P.; HORST, R.L. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. **The Veterinary Journal**, v.188, p.122-124, 2011.

RICO, J.E.; BANDARU, V.V.R.; DORSKIND, J.M.; HAUGHEY, N.J.; McFADDEN, J.W. Plasma ceramides are elevated in overweight Holstein dairy cows experiencing greater lipolysis and insulin resistance during the transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.7757-7770, 2015.

ROCHE, J.R. 2003. The incidence and control of hypocalcemia in pasture-based systems. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.97, p.141-144, 2003.

ROCHE, J.R.; BELL, A.W.; OVERTON, T.R.; LOOR, J.J. Nutritional management of the transition cow in the 21st century: a paradigm shift in thinking. **Animal Production Science**, v.53, p.1000-1023, 2013.

ROCHE, J.R.; FRIGGENS, N.C.; KAY, J.K.; FISHER, M.W.; STAFFORD, K.J.; BERRY, D.P. Invited review: body condition score and its association with dairy cow productivity, health and welfare. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.5769-5801, 2009.

SAMUELSON, D.J.; DENISE, S.K.; ROFFLER, R.; AX, R.L.; ARMSTRONG, D.V.; ROMAGNOLO, D.F. Response of Holstein and Brown Swiss cows fed alfalfa hay-based diets to supplemental methionine at two stages of lactation. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.4, p. 917-928, 2001.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's Guide**: statistics, version 6. 4.ed. North Caroline, v.3, 943p. 2002.

SAXTON, R.A.; SABATINI, D.M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. **Cell**, v.168, p.960-976, 2017.

SCHWAB, C. G. 2007. **Protected proteins and amino acids for ruminants**. In: *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*, p.115-141. Wiley-VCH Verlag GmbH.

SEIFI, H.A., MIRSHOKRAIE, P., FARZANEH, N. Metabolic profile test in Iran: variations of metabolites around parturition at dairy cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.44 (Suppl. 1):p.1213, 2003.

SHERMA, N.; SINGH, N.K.; BHADWAL, M.S. Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v.24, n.3, p.429-438, 2011.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de Alimentos, métodos químicos e biológicos**. 3ª. ed. - 4ª reimpressão. Universidade Federal de Viçosa, p.235, 2009.

SKENANDORE, C.S.; ACOSTA, D.A.V., ZHOU, Z.; RIVELLI, M.I.; CORREA, M.N.; LUCHINI, D.; CARDOSO, F.C. Effects of rumen-protected methionine and choline supplementation on vaginal discharge and uterine cytology of Holstein cows. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v.5, p.1-7, 2017.

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, p.1113-1126, 2005.

SORDILLO, L.M. Nutritional Strategies to optimize dairy cattle immunity. **Journal of Dairy Science**, v.99, p.4967-4982, 2016.

SORDILLO, L.M.; AITKEN, S.L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, p.104-109, 2009.

SORDILLO, L.M.; MAVANGIRA, V. The nexus between nutrient metabolism, oxidative stress and inflammation in transition cows. **Animal Production Science**, v.54, n.9, p.1204-1214, 2014.

SORDILLO, L. M.; RAPHAEL, W. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.29, p.267-278, 2013.

STELLA, S.L.; VELASCO-ACOSTA, D.A.; SKENANDORE, C.; ZHOU, Z.; STEELMAN, A.; LUCHINI, D.; CARDOSO, F.C. Improved uterine immune mediators in Holstein cows supplemented with rumen-protected methionine and discovery of neutrophil extracellular traps (NET). **Theriogenology**, v.114, p.116-125, 2018.

STOKOL, T; NYDAM, D.V. Effect of anticoagulant and storage conditions on bovine nonesterified fatty acid and beta-hydroxybutyrate concentrations in blood. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.3139-3144, 2005.

SUGIMOTO, Y.; SUMIYA, S.; HARUNO, A.; MIURA, M.; SHINZATO, I.; SATAKE, N. Maternal supplementation of rumen-protected lysine and methionine during the close-up period improves the nutritional status of Holstein calves. **Journal of Dairy Science**, v.102, (Suppl. 1), p.61, 2019.

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**, v.8, n.8, e0160659, 2016.

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

TAMURA, T.; INOUE, K.; NISHIKI, H.; SAKATA, M.; SEKI, M.; KOGA, T.; OOKUBO, Y.; AKUTSU, K.; SATO, S.; SAITOU, K.; SHINOHARA, H.; KURAI, T.; HAJIKAWA, H.; KURIHARA, M. Effects of rumen-protected methionine on milk production in early

lactation dairy cattle fed with a diet containing 14.5% crude protein. **Animal Science Journal**, v.90, p.62-70, 2019.

TAO, S.; BUBOLZ, J.W.; DO AMARAL, B.C.; THOMPSON, I.M.; HAYEN, M.J.; JOHNSON, S.E.; DAHL, G.E. Effect of heat stress during the dry period on mammary gland development. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.5976-5986, 2011.

TAO, S.; DAHL, G. E. Invited review: heat stress effects during late gestation on dry cows and their calves. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.1-15, 2013.

TEIXEIRA, I.A.M.A.; YODER, P.S.; HUANG, E.; HUANG, X.; HANIGAN, M.D. Essential amino acids influence milk fat synthesis in mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, v.102, (Suppl. 1), p.119, 2019.

TENNANT, B.C.; CENTER, S.A. **Hepatic function**, p.379-412. In: Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. (Eds), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6<sup>a</sup> ed. Academic Press, Burlington, 2008.

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

TREVISI, E.; MINUTI, A. Assessment of the innate immune response in the periparturient cow. **Research in Veterinary Science**, v.116, p.47-54, 2018.

VAN DER DRIFT, S.G.A.; HOUEWLING, M.; SHONEWILLE, J.T.; TIELENS, A.G.M. JORRITSMA, R. Protein and fat mobilization and associations with serum Beta-hydroxybutyrate concentrations in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.4911-4920, 2012.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition, **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583-3597, 1991.

WHITE, H.M. The role of TCA cycle anaplerosis in ketosis and fatty liver in periparturient dairy cows. **Animals**, v.5, p.793–780, 2015.

WU, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, v.37, p.1-17, 2009.

ZANTON, G.I.; BOWMAN, G.R.; VAZQUEZ-AÑÓN, M.; 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**, v.97, p.7085-7101, 2014.

ZENOBI, M.G., GARDINAL, R., ZUNIGA, J.E. Effects of supplementation with ruminally protected choline on performance of multiparous Holstein cows did not depend upon prepartum caloric intake. **Journal of Dairy Science**, v.101, p.1-23, 2018.

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, p.8956-8969, 2016b.

ZHOU, Z.; VAILATI-RIBONI, M.; LUCHINI, D.; LOOR, J.J. Methionine and choline supply during the periparturient period alter plasma amino acid and one-carbon metabolism profiles to various extents: Potential role in hepatic metabolism and antioxidant status. **Nutrients**, v.9, p.10, 2017.

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, p.1-17, 2016a.

ZIMPEL, C.; POINTDEXTER, M.B.; VIEIRA-NETO, A.; et al. Effect of dietary cation-anion difference on acid-base status and dry matter intake in dry pregnant cows. **Journal of Dairy Science**, v.101, p.8461-8475, 2018.

## APÊNDICE 1 - CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 053/2016, referente ao projeto “Efeito da suplementação de metionina protegida ruminalmente para vacas leiteiras no período de transição”, sob a responsabilidade de **Rodrigo de Almeida** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 1 de invasividade, em reunião de 10/08/2016.

Vigência do projeto	Maio/2017 até Setembro/2017
Espécie/Linhagem	<i>Bos taurus taurus</i> / Holândes
Número de animais	400
Peso/Idade	625 / 24-96 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Fazenda Frank'Anna - Carambei, Paraná, Brasil

### CERTIFICATE

We certify that the protocol number 053/2016, regarding the project “Effect of ruminally protected methionine supplementation for dairy cows in the transition period” under **Rodrigo de Almeida** supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 1 of invasiveness, in session of 08/10/2016.

Duration of the project	May/2017 until September/2017
Specie/Line	<i>Bos taurus taurus</i> (bovine) / Holland
Number of animals	400
Weight/Age	625 / 24-96 months
Sex	Females
Origin	Frank'Anna Farm – Carambei, Paraná, Brazil

Curitiba, 10 de Agosto de 2016.

  
 Simone Tostes de Oliveira Stedile

Presidente CEUA-SCA